

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ VYBRANÝCH CHEMICKÝCH PARAMETRŮ PLODŮ MODERNÍCH ODRŮD ANGREŠTŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA JAVORSKÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ VYBRANÝCH CHEMICKÝCH PARAMETRŮ PLODŮ MODERNÍCH ODRŮD ANGREŠTŮ

DETERMINATION OF SELECTED CHEMICAL PARAMETERS OF FRUITS OF MODERN
GOOSEBERRY VARIETIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA JAVORSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0825/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Kateřina Javorská	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. František Paprštejn, CSc.	

Název diplomové práce:

Stanovení vybraných chemických parametrů plodů moderních odrůd angreštů

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná botanická charakteristika angreštu, jeho využití v potravinářství, biologicky aktivní látky angreštu
- 2) Anthokyany a jejich vlastnosti, využití v potravinářském průmyslu, metody stanovení
- 3) Vitamin C, jeho vlastnosti a význam, metody stanovení
- 4) Celková antioxidační kapacita, metody jejího stanovení

Experimentální část:

- 1) Ověření vybraných metod stanovení jednotlivých chemických parametrů na standardech
- 2) Stanovení vybraných chemických parametrů ve vzorcích studovaných odrůd angreštu
- 3) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Kateřina Javorská
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením jednotlivých chemických parametrů v moderních odrůdách angreštu (*Grossularia uva-crispa*). Teoretická část je zaměřena na botanickou charakteristiku rostliny, popis vybraných odrůd, chemické složení a potravinářské využití plodů. Druhá polovina teoretické části je věnována charakteristice vybraných nutričních parametrů a metodám stanovení celkových anthokyanů, fenolických látek, vitamínu C a antioxidační aktivity.

V experimentální části byla provedena analýza celkem 17 odrůd angreštu, které pocházejí od pěstitele Vondráčka a z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích. Ke stanovení monomerních anthokyanů byla použita pH diferenciální metoda. Celkový obsah polyfenolů byl stanovován pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Dále byl ve všech odrůdách stanoven obsah vitamínu C metodou HPLC a zhodnocena celková antioxidační aktivita s využitím radikálu DPPH. Jednotlivé odrůdy angreštu byly nakonec porovnány podle obsahu stanovovaných chemických parametrů.

ABSTRACT

Diploma thesis deals with determination of individual chemical parameters contained in modern varieties of gooseberries (*Grossularia uva-crispa*). The theoretical part is focused on the botanical characteristics of the plant, a description of selected varieties, chemical composition and food utilization fruits. The second half of the theoretical part is devoted to the characterization of selected nutritional parameters and methods for determination of total anthocyanins, phenolic compounds, vitamin C and antioxidant activity.

Total of 17 varieties of gooseberries, which come from growers Vondráček and the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd. were analyzed in the experimental part. pH differential method was used to determination total monomeric anthocyanins. Total content of polyphenols were determined by using the Folin-Ciocalteu reagent. Next was determined content of vitamin C in all varieties by HPLC and was evaluated the total antioxidant activity using radical DPPH. In conclusion, individual varieties of gooseberries were compared by the contents of the determined chemical parameters.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Angrešt (*Grossularia uva-crispa*), anthokyany, polyfenoly, vitamin C, antioxidační aktivita, HPLC, pH diferenciální metoda.

KEYWORDS:

Gooseberry (*Grossularia uva-crispa*), anthocyanins, polyphenols, vitamin C, antioxidant activity, HPLC, pH differential method.

JAVORSKÁ, K. *Stanovení vybraných chemických parametrů plodů moderních odrůd angreštů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 111 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph. D. za odborné vedení práce, čas, ochotnost a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále Ing. Jitce Cetkovské a Ing. Zuzaně Olšovcové za praktické rady a pomoc při experimentální práci. Jsem vděčná také své rodině a blízkým za podporu během studia.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Srstka angrešt (<i>Grossularia uva-crispa</i>).....	9
2.1.1	Klasifikace [5,6,7].....	9
2.1.2	Historie a rozšíření pěstování angreštu.....	9
2.1.3	Význam pěstování angreštu.....	10
2.1.4	Nároky na stanoviště.....	10
2.1.5	Podnože pro angrešty.....	10
2.1.6	Pěstitelské tvary a typy výsadeb.....	11
2.1.7	Výživa a hnojení angreštu.....	11
2.1.8	Pomologie vybraných odrůd.....	11
2.1.9	Škůdci a choroby angreštu.....	14
2.1.10	Rozdělení zralosti angreštu.....	16
2.1.11	Biologické znaky a vlastnosti odrůd angreštu.....	17
2.1.12	Využití plodů pro potravinářské účely.....	18
2.1.13	Situace v ČR.....	19
2.2	Účinné látky obsažené v plodech angreštu.....	19
2.2.1	Sacharidy.....	21
2.2.2	Pektinové látky.....	21
2.2.3	Vitaminy.....	22
2.2.4	Minerální látky.....	23
2.3	Anthokyaniny.....	24
2.3.1	Struktura a názvosloví.....	25
2.3.2	Výskyt.....	26
2.3.3	Použití anthokyanů.....	27
2.3.4	Faktory ovlivňující stabilitu anthokyanů.....	27
2.3.5	Metody stanovení anthokyanů.....	31
2.4	Fenolické látky.....	34
2.4.1	Chemie fenolických sloučenin.....	34
2.4.2	Aplikace fenolických sloučenin.....	36
2.4.3	Metody stanovení fenolických sloučenin.....	36
2.5	Vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová).....	37
2.5.1	Struktura vitamínu C.....	37
2.5.2	Význam.....	38
2.5.3	Stabilita.....	39
2.5.4	Přírodní zdroje.....	39
2.5.5	Biochemie.....	40
2.5.6	Fyziologie a výživa.....	40
2.5.7	Použití vitamínu C.....	40
2.5.8	Metody stanovení vitamínu C.....	40
2.6	Celková antioxidační aktivita.....	43
2.6.1	Antioxidanty.....	43
2.6.2	Metody stanovení antioxidační aktivity.....	43

2.7	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	44
2.7.1	Instrumentace v HPLC	45
2.7.2	Stacionární fáze	48
2.8	Molekulová absorpční spektrometrie v oblasti UV-VIS	49
2.8.1	Přístrojové vybavení	49
2.8.2	Využití spektrofotometrie	50
3	Experimentální část	51
3.1	Použité vzorky	51
3.2	Pomůcky	52
3.3	Přístroje	52
3.4	Chemikálie	53
3.5	Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou	53
3.5.1	Příprava roztoků	53
3.5.2	Příprava vzorku	53
3.5.3	Vlastní stanovení	54
3.5.4	Výpočty	54
3.6	Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla	54
3.6.1	Příprava roztoků	54
3.6.2	Příprava vzorku	55
3.6.3	Vlastní stanovení	55
3.6.4	Výpočty	55
3.7	Stanovení vitamínu C metodou HPLC	55
3.7.1	Příprava roztoků	55
3.7.2	Příprava vzorku	56
3.7.3	HPLC analýza	56
3.7.4	Stanovení celkového množství vitamínu C	57
3.8	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	57
3.8.1	Příprava roztoků	57
3.8.2	Příprava vzorku	57
3.8.3	Vlastní stanovení	57
3.8.4	Výpočty	58
3.9	Statistické zpracování výsledků	58
4	Cíl práce	60
5	Výsledky a diskuze	61
5.1	Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou	61
5.1.1	Zelenoplodé odrůdy	61
5.1.2	Žlutoplodé odrůdy	63
5.1.3	Červenoplodé odrůdy	65
5.1.4	Statistické zpracování celkového obsahu monomerního pigmentu	67
5.2	Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla	69
5.2.1	Zelenoplodé odrůdy	70
5.2.2	Žlutoplodé odrůdy	72
5.2.3	Červenoplodé odrůdy	74
5.2.4	Statistické zpracování	76

5.3	Stanovení vitamínu C metodou HPLC	78
5.3.1	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení vitamínu C metodou HPLC.....	79
5.3.2	Stanovení vitamínu C v zelenoplodých odrůdách.....	80
5.3.3	Stanovení vitamínu C ve žlutoplodých odrůdách	81
5.3.4	Stanovení vitamínu C v červenoplodých odrůdách	83
5.3.5	Statistické zpracování.....	85
5.4	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	88
5.4.1	Zelenoplodé odrůdy.....	89
5.4.2	Žlutoplodé odrůdy.....	90
5.4.3	Červenoplodé odrůdy	91
6	Závěr	92
7	Seznam použitých zdrojů	94
8	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	103
9	Seznam příloh	105
10	Přílohy	106

1 ÚVOD

Pro obsah vitaminů, kyselin, minerálů, chuťových látek i pro dietetické a léčivé účinky patří angrešt mezi velmi cenné ovocné druhy. Angrešt (*Grossularia uva-crispa*) náleží do čeledi lomikamenovitých (*Saxifragaceae*). I přes značný obsah biologicky cenných látek nepatří zrovna mezi populární druhy ovoce. Sklízají se plody, které mají velmi nízkou kalorickou hodnotu díky malému obsahu sacharidů, tuků a dusíkatých látek. Plody mají kyselou a trpkou chuť, lze je konzumovat čerstvé, kyselejší druhy jsou vhodné k zavařování či k přípravě různých pokrmů

První zmínka o angreštu pochází ze 12. století, kdy byl uveden pod označením Grossellier ve francouzské knize žalmů. V Rusku se pěstoval již od 11. století především v klášterních zahradách. Postupně se začal rozšiřovat do Francie, Německa a Anglie, kde se ve druhé polovině 16. století stal neoblíbenějším ovocem. Koncem osmnáctého století bylo známo přibližně 71 odrůd, v polovině devatenáctého století již 722 a dnes již existuje přes 3 000 nejrozličnějších odrůd angreštu. Původní hmotnost planých angreštů se pohybovala kolem 0,5 g, v současnosti mají nově vyšlechtěné odrůdy hmotnost až 100 x vyšší.

U nás se o rozšíření zasloužil především šlechtitel J. Proche ze Sloupna a školkař J. Šámal z Mladé Boleslavi. Šlechtitelé se dnes zaměřují na vyšlechtění odrůd, které jsou plodné, vhodné velikosti, vzpřímeného vzrůstu, méně ostnaté, s menším obsahem semen a hlavně odolné proti americkému padlí a antraknóze [18].

Pro angrešt je charakteristický především vysoký obsah vody. Množství cukrů, fruktózy a glukózy závisí především na odrůdě. Dostatečné množství pektinových látek umožňuje snadné želírování konzervářských výrobků. Velmi důležitým faktorem je obsah vitamínu C, který je zde přítomen především ve formě kyseliny L-askorbové. Obsah vitamínu C v plodech vzrůstá až do doby ukončení růstu, při zrání se obsah snižuje až o jedno procento denně [11]. Jeho obsah je ovlivňován klimatickými podmínkami a samotnými odrůdami. Mezi další významné látky patří anthokyany, které jsou důležité rostlinné pigmenty viditelné pro lidské oko. Patří do rozsáhlé skupiny fenolických sloučenin se společným názvem flavonoidy. Tyto pigmenty jsou zodpovědné za oranžové, červené, fialové a modré zbarvení ovoce, zeleniny, květů a plodů některých rostlin. Nejrozšířenějším anthokyanem je kyanidin 3-glukosid, který je také hlavním anthokyanem v angreštu [47]. Významnou vlastností všech těchto látek je jejich antioxidační aktivita, která hraje důležitou roli v prevenci nervových a kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a cukrovky.

Diplomová práce je součástí projektu Ministerstva zemědělství číslo QI111A141 s názvem: Výzkum nových technologií v pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na kvalitu a využití plodů. Cílem práce bylo stanovení vybraných chemických parametrů v moderních odrůdách angreštu pocházejících ze dvou různých stanovišť. Anthokyany byly stanoveny pomocí pH diferenciální metody a celkové polyfenoly za použití Folin-Ciocalteuova činidla. Celkový obsah vitamínu C byl zjištěn pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a pomocí radikálu DPPH byla určena antioxidační aktivita.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Srstka angrešt (*Grossularia uva-crispa*)

Angrešt, botanickým názvem srstka obecná (*Ribes grossularia*), na Moravě se můžeme setkat s názvem chlupáček. Lidově se angreštu také říká „chlupaté víno“, setkáváme se i s pojmenováním „rybíz angrešt“, protože je s rybízem botanicky příbuzný. Na rozdíl od rybízu má však větší a chlupaté plody a bývá trnitý.

Angrešt je známá, opadavá a ostnatá dřevina s prutovitými větvemi, které na jaře obrůstají listy většinou třílaločnými, hrubě pilovitými a leskle zelenými. Listy bývají pokryty jemnými chloupky, aby se tak mohly chránit před nočním ochlazením. Plod bývá lysý, ochmýřený nebo až ostnitý, tvar mívá kulatý, oválný a hruškovitý. Dužina angreštu může být sladká, kyselá, sladkokyselá, aromatická i bez aromatu. Na českém trhu se vyskytují odrůdy bílé, žluté, zelené a červené podle barvy slupky.

Slovo angrešt pochází z latinského slova *agrestis* = polní, planý. *Ribes* pochází údajně z arabského ribaš a *grossularia* z latinského *grossus* = tlustý, dužnatý [1,2,3,4].

2.1.1 Klasifikace [5,6,7]

Říše:	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Oddělení:	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	Vyšší dvouděložné rostliny (<i>Rosopsida</i>)
Podtřída:	Rosidae
Řád:	Lomikamenotvaré (<i>Saxifragales</i>)
Čeleď:	Meruzalkovité (<i>Grossulariaceae</i>)
Rod:	Meruzalka (<i>Ribes</i>)

2.1.2 Historie a rozšíření pěstování angreštu

Srstka angrešt se dělí do dvou sekcí: *Robsonia* a *Grossularia*. Pravlastí angreštu je Evropa, Amerika a střední Asie. Jako letní ovoce je oblíbený v Evropě už od středověku.

Druhy rodu *Grossularia* se pěstovaly asi od 12. století, především v klášterních zahradách. Jako první popsal tento rod Ruellie v roce 1536. Běžně se však začal pěstovat až od 16. století, kdy mu největší pozornost věnovali Angličané. V 16. století také přicházejí první zmínky o angreštu z Itálie. Podle literárních pramenů byl v minulosti angrešt hodně rozšířen také v Rusku, kde se za cara Ivana III. pěstoval v moskevských zahradách. Obliba pěstování angreštu se rozšířila do dalších zemí především do Německa, kde dnes patří mezi nejoblíbenější druhy ovoce.

V roce 1797 popsal E. L. Christe 71 odrůd a po roce 1831 jich bylo známo už 722. Původní hmotnost planých angreštů byla 0,4 až 0,6 g, postupným šlechtěním se zvětšila až na 56 g.

První zmínka o angreštu v Čechách pochází z roku 1772, více se rozšířil až koncem 19. století, kdy byly vyšlechtěny odrůdy Česká koruna a Zlatý fík. Tyto odrůdy se dostaly na stejnou úroveň s nejlepšími anglickými a německými odrůdami. U nás se o jeho pěstování nejvíce zasloužil šlechtitel J. Proche ze Sloupna a školkař J. Šámal z Mladé Boleslavi. Do Německa se z Čech rozšířil způsob roubování na meruzalku zlatou [2,5,8,9,10].

2.1.3 Význam pěstování angreštu

Angrešt spolu s rybízem se poslední dobou stává stále oblíbenějším druhem ovoce u drobných pěstitelů a zahrádkářů, hlavně díky jeho vlastnostem. Obsahuje vysoké množství vitaminů, především vitaminu C a dalších zdraví prospěšných látek. Pro zahrádkáře má jeho pěstování řadu výhod (např. brzký začátek plodnosti). Oblíbenost angreštu stále více stoupá také hlavně díky vzniku nových odrůd, které jsou odolnější proti napadení americkým padlím angreštovým. Šlechtitelé se zaměřují na vyšlechtění odrůd vzpřímeného vzrůstu, méně ostnaté, s velkými plody, které obsahují méně semen, ale větší obsah pektinů [4,8,11].

2.1.4 Nároky na stanoviště

Pro úspěšné pěstování angreštu je třeba se seznámit se základními požadavky na prostředí. Mezi ty, na které musíme brát ohled, patří klimatické podmínky (světlo, teplo, voda), půdní podmínky (typ půdy, živiny) a topografické faktory (zeměpisná poloha, nadmořská výška, tvar povrchu).

Základní podmínkou pro růst je teplo. Angrešt patří mezi ovoce, které je náročnější na teplotu. Vyhovuje mu stanoviště s průměrnou roční teplotou 7 – 9 °C. Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje plodnost a intenzitu zbarvení plodů je světlo. Patří mezi ovocné druhy, které dávají přednost částečnému stínu, přímé sluneční světlo může způsobit úžeh plodů a listů. Významným vegetačním faktorem je voda, angrešt nemá rád sucho ani přílišné zamokření. Ideální je pro něj stanoviště, kde spadne 650 mm srážek za rok.

Z hlediska půdních podmínek patří mezi nenáročné plodiny. Angrešt vyžaduje především půdy středně těžké, písčitohlinité, přiměřeně vlhké. Nejsou vhodné příliš suché, těžké ani jílovité půdy. Má vysoké požadavky na obsah humusu v půdě a nejvhodnější jsou půdy s neutrální až slabě kyselou reakcí. Angreštu nejvíce vyhovují polohy 300 – 600 m. n. m., nejvhodnější jsou otevřené polohy s mírným prouděním vzduchu [5,8,12,13,14].

2.1.5 Podnože pro angrešty

Podnož je rostlina, na kterou se štěpuje vegetativní část vyšlechtěné odrůdy. Podnož by měla dobře srůstat s roubem, zvyšovat plodnost, měla by růst rovně a vzpřímeně. Také musí být odolná proti různým chorobám a škůdcům, především proti botrytidě.

Vhodnou podnoží pro angrešt je meruzalka zlatá (*Ribes aureum*). Slouží jako podnož především pro stromkové angrešty hlavně díky jejímu rychlému růstu. Od ostatních podnoží se odlišuje tím, že se štěpuje až v korunce a nikoliv u země. Podnože můžeme vypěstovat generativně nebo přímým vegetativním rozmnožováním, jako je tomu u meruzalky zlaté.

Registrované podnože můžeme rozdělit do tří skupin:

1. ME-LS-A – byla vyšlechtěná ve SŠ Velehrad a Velké Losiny. Podnož je známá svou dobrou výtěžností a tvoří středně silné, rovné pruty o délce 100 cm. Je vhodná pro slabé rouby a používá se v teplejších oblastech.

2. ME-LS-B – pochází ze stejného místa jako ME-LS-A. Vyznačuje se dobrou výtěžností a má vysoké, robustní pruty o délce 120 cm, které dobře vyžívají. Je vhodný pro silnější rouby angreštu.
3. ME-LS-C – má stejný původ jako předchozí podnože. Její pruty jsou dlouhé 80 cm, dokonale vyžívají a velmi dobře koření. V porovnání s ostatními podnožemi má nižší výtěžnost [5,8].

2.1.6 Pěstitelské tvary a typy výsadeb

Angrešt lze pěstovat v různých tvarech, nejvíce se však pěstuje ve tvaru keře a stromku. Nejpřirozenějším tvarem angreštu je keř, ale oblíbenější je stromková forma.

Keř

Keře bývají vysoké až 1 m, větvičky jsou vzpřímené a tvar keře bývá obloukovitý až poléhavý. Před sklizní se keře často sklánějí k zemi, dochází tak k znečištění plodů. U keře by mělo být 8 – 12 základních větví, záleží na vzrůstu keře a odrůdě. Keře se vysazují ve vzdálenosti 0,7 – 1,5 m od sebe. Životnost keře je větší než u stromku a dožívá se až 20 let. Keř s porovnáním se stromkem plodí mnohem více okolo 2,7 – 5,5 kg, u stromku je to jen 0,9 – 1,4 kg.

Stromek

Angrešt se pěstuje hlavně ve tvaru stromku. Pěstuje se na kmínku meruzalky zlaté, kdy rozeznáváme různé tvary (např. vysokokmen, polokmen a čtvrtkmen). Kmínek mají vysoký 0,9 až 1,1 m. Angrešt na kmínku má kratší životnost než keř, dožívá se pouze 8 – 12 let. Stromky vysazujeme ke kolíku, který by měl sahat nad korunku. Místo kolíku lze také použít pozinkovaný drát, který se natahuje ve výši korunky. Stromky se vysazují ve vzdálenosti 1 m od sebe. Na stromcích jsou plody větší, dají se lépe sklízet a půda pod stromky se lépe obdělává [8,15,16,17].

2.1.7 Výživa a hnojení angreštu

Hnojením ovlivňujeme mnoho faktorů jako je třeba růst, plodnost, stárnutí a věk. Angrešt patří mezi druhy, které mají vysoké nároky na výživu, zvláště na organické hnojení. Požadavky na množství dodávaných živin se mění v závislosti na odrůdě. Rostlina čerpá z půdního roztoku dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík s mnoho dalších důležitých látek. Kromě dusíku se všechny důležité prvky nacházejí v horninách, z kterých pak zvětráváním a půdotvornými procesy vzniká půda [12].

2.1.8 Pomologie vybraných odrůd

Mezi nejdůležitější odrůdy angreštu, které se pěstují, patří k druhu angrešt malotrný (*Grossularia hirtella*), angrešt trnitý (*Grossularia cynosbatii*) a angrešt Douglasův (*Grossularia divaricata*). Angrešt byl v 18. století J. L. Christem rozdělen do 50 odrůd. Odrůdy se rozdělují podle barvy, podle tvaru a podle doby dozrání. Podle tvaru se rozlišují na kulaté, eliptické, vejčité, hruškovité, podle doby zralosti se pak angrešt rozděluje na odrůdy rané, středně rané a pozdní. Základní rozdělení je však podle barvy slupky a podle ní se více než 3 000 odrůd dělí na běloplodé, zelenoplodé, žlutoplodé a červenoplodé odrůdy [5,18].

2.1.8.1 Zelenoplodé odrůdy

Prima

Je to odrůda domácího původu registrována až v roce 2003. Plody má velké až velmi velké elipsovitého tvaru. Zbarvení slupky je zelenožluté se středním žilkováním, slupka je tlustá, pevná a bez ochmýření. Plody mají aromatickou, sladkokyselou chuť. Patří mezi zelenoplodé odrůdy. Habitus (celkový vnější vzhled) keře je kulovitý, středně hustý, stromkové tvary vytváří polokulovitou korunu. Rostlina je silně pokryta trny. Odolnost proti napadení americkým padlím angreštovým je vysoká a proti napadení antraknózou je také vysoká. Odrůda patří mezi středně náročné na polohu, vyžaduje úrodné půdy s dostatkem živin a vláhy. Plody jsou vhodné pro přímý konzum i pro konzervářské zpracování. Tato odrůda je velmi ceněna, vzhledem k vysoké odolnosti proti houbovým chorobám [5].

Rixanta

Odrůda pocházející z Německa má střední plody elipsovitého až kulovitého tvaru. Zelenožlutá slupka je pevná, bez ojínění a jen slabě ochmýřená. Má sladce navinulou, středně aromatickou chuť. Patří mezi zelenoplodé odrůdy (viz *Obrázek č. 1*). Keře mají zploštělé elipsovité tvar, stromky vytvářejí kulovitou, středně hustou korunu. Plodnost je velká a pravidelná. Odolnost proti americkému padlí je vysoká. Je vhodné je vysazovat v polohách bez jarních mrazíků na lehčích půdách. Plody můžeme použít pro konzervářské zpracování i pro přímý konzum. Odrůda není příliš náročná na chemické ošetření [5].



Obrázek č. 1: Zelenoplodá odrůda [19]

2.1.8.2 Žlutoplodé odrůdy

Citronový obří

Odrůda pochází z Anglie, z odrůdy Two to One. Plody jsou velké 9,6 – 11,3 g a mají elipsovité tvar. Slupka bývá sytě žlutá, středně tlustá, středně ojíněná a bez ochmýření. Dužnina má aromatickou sladkokyselou chuť. Patří mezi žlutoplodé odrůdy a dozrává v druhé polovině července. Odrůda má velké množství trnů. Celkově je to nenáročná odrůda, vyžaduje hlinité a hlinitopísčité půdy s neutrální reakcí. Je náchylná k napadení americkým padlím angreštovým, proti antraknóze je však odolná. Plody jsou chuťově velmi dobré, a proto jsou vhodné pro přímý konzum [5,8].

Invicta

Tato odrůda pochází z East Malling v Anglii. Plody jsou středně velké oválného tvaru. Slupka bývá světle zelená, tenká, jemně ochmýřená. Plody mají harmonicky sladkou chuť. Patří mezi žlutoplodé odrůdy a dozrává v druhé polovině července. Plodnost je u odrůdy vysoká a pravidelná. Je stále oblíbenější odrůdou, hlavně díky její odolnosti proti americkému padlí. Nemá speciální požadavky na polohu, vyžaduje středně těžké půdy, které jsou dobře zásobené živinami. Díky sladké chuti jsou plody vhodné, jak pro přímý konzum, tak pro konzervářské zpracování [5,20].

Zlatý fík

Patří k odrůdám domácího původu, vypěstoval ji pravděpodobně J. E. Proche ve Sloupně. Mezi pěstiteli je hodně rozšířena. Keře jsou zpočátku vzpřímené, později mírně převísle s řidším obrostem. Je to středně ostnitá odrůda, ostny jsou většinou jednoduché. Plody dozrávající v polovině července jsou velké, vejčitého tvaru. Slupka má zlatožlutou barvu, je pevná, jemná a chloupkatá (viz *Obrázek č. 2*). Chuť je sladce navinulá až sladká, aromatická. Tato velkoplodá odrůda patří mezi nechutnější a nejoblíbenější, je vhodná především pro přímý konzum. Vyžaduje vlhčí, hlinité, humóznější půdy. Je velmi cenná pro drobné pěstitele [8,11,21].



Obrázek č. 2: Žlutoplodá odrůda – Zlatý fík [22]

2.1.8.3 Červenoplodé odrůdy

Remarka

Je to červenoplodá odrůda (viz *Obrázek č. 3*) původem z Německa a na trhu je od roku 1970. Patří mezi středně rané odrůdy, plody tedy dozrávají v první polovině července. Plody jsou středně velké, široce oválné a jejich slupka je tmavě červená, tenká a jen mírně ochlupená. Mají velmi šťavnatou, osvěžující dužninu s nakyslou chutí a typické angreštové aroma. Na časně zrající odrůdu rodí velmi chutné ovoce [20].

Rolonda

Tato červenoplodá odrůda pochází z Německa. Plody jsou středně velké elipsovitého tvaru. Barva slupky může být tmavě červená až hnědě fialová. Slupka bývá středně tlustá, pevná, slabě ochmýřená a bez chloupků. Má navinulou až nakyslou chuť. Habitus keře je kulovitý, středně hustý a stromkové tvary vytváří kulovitou, hustou korunu. Plody této odrůdy dozrávají pozdě a plodnost bývá velká a pravidelná. Je vysoce odolná proti americkému padlí angreštovému a není příliš náročná na půdní a klimatické podmínky. Je vhodná zejména pro přímý konzum, ale i ke kompotování [5].



Obrázek č. 3: Červenoplodá odrůda [23]

2.1.9 Škůdci a choroby angreštu

Botrytida angreštu (Botritis cinerea)

Je to rozšířená houba, která způsobuje odumírání jednotlivých výhonů i celých keřů. Choroba se nejčastěji projevuje na jaře u stromkových rybízů, kdy nedochází k rašení výhonů a poté hned odumírají. Krátce před sklizní dochází k odumírání dalších částí keřů, listy se zbarvují do hněda a předčasně opadávají. Bobule se postupně scvrkávají a poté taky opadnou. Rostliny můžeme chránit pouze nepřímo, a to správnou výživou a opatrným řezem [8,11].

Antraknóza rybízu (Drepanopeziza ribis)

Je jednou z nejrozšířenějších houbových chorob, která napadá angrešt. Napadá především listy, na kterých způsobuje žluté, později hnědé skvrny. Napadené listy zpočátku žloutnou, pomalu začínají usychat a nakonec upadnou. Skvrny se mohou objevit i na stopkách bobulí, ty pak zasychají. Choroba se nejvíc rozšiřuje ve vlhkých a teplých letech. Ochrana spočívá v použití chemických přípravků. Důležité je také spálit napadené listy [11,21].

Americké padlí angreštové (Sphaerotheca mors-uvae)

Tato houba patří do čeledi *Erysiphaceae* a třídy *Ascomycetes*. Houba způsobuje na plodech, listech, špičkách letorostů, řapících bílé povlaky mycelia, které postupně mění svou barvu na hnědou. Tyto hnědé povlaky můžeme vidět na *Obrázku č. 4*. Napadené plody přestávají růst, špatně vyzrávají, jsou nevzhledné a často opadávají. Napadené letorosty se deformují, nerostou a často odumírají, listy jsou malé a časem opadávají.

Houba přezimuje myceliem na napadených letorostech, na jaře se šíří prostřednictvím askospor, které infikují mladé výhonky, listy nebo plody. Choroba patří mezi velmi významnou, snižuje výnosnost odrůdy i kvalitu samotných plodů.

Nejvíce bývají postiženy keře v zastíněných oblastech a špatně větraných lokalitách. Účinnou ochranou je včasné odstranění napadených plodů a konců letorostů [8,24,25,26].



Obrázek č. 4: Americké padlí angreštové [27]

Evropské padlí angreštové (Microsphaera grossulariae)

Stejně jako předchozí houba patří do čeledi *Erysiphaceae*, ale nepůsobí takové škody. Houba se na angreštech vyskytuje poměrně zřídka. Napadá pouze listy a výhonky, na kterých asi od července tvoří bílé, nehnědnoucí povlaky. Houba přezimuje prostřednictvím kleistothecií a šíří se prostřednictvím askospor. Postižená místa nerostou a listy mohou uschnout [8,24].

Mšice srstková (Aphidula grossulariae)

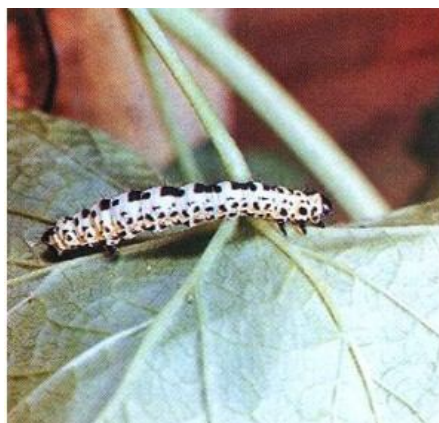
Mšice je velmi rozšířená a vysoce škodlivá. Sáním šťávy způsobuje kroucení listů, napadá konce letorostů a způsobuje krnění až zastavení růstu letorostů. Zkroucené listy se shlukují na vrcholku výhonu a tvoří tak hnízdové shluky, ve kterých je mnoho mšic (viz Obrázek č. 5). Mšice později vylučují lepkavé výkaly – medovici, kterou se živí mravenci. Silný výskyt mšic oslabuje keře a snižuje jejich plodnost. Ochrana proti mšicím spočívá v použití insekticidních přípravků [8,21,24].



Obrázek č. 5: Mšice srstková [28]

Píd'alka angreštová (Abraxas grossulariae)

Patří mezi nebezpečné škůdce angreštu. Housenka, kterou vidíme na *Obrázku č. 6.* je pestrá a přezimuje v pavučinových zámotcích připevněných k listu. Zjara začíná vylézat, ožírat pupeny a později listy. Začátkem léta se housenky kuklí a vylíhlí motýlci kladou vajíčka na spodní straně listů. Housenky pak na konci léta vyžírají drobné dírký ze spodní strany listů. Keře značně oslabují a snižují tak úrodu [11,21].



Obrázek č. 6: Píd'alka angreštová [29]

2.1.10 Rozdělení zralosti angreštu

Doba zrání je u angreštu charakteristickou vlastností odrůd. Na zralosti ovoce závisí konzistence, aroma, chuť, vybarvení a mění se i chemické složení. Během zrání roste obsah cukrů, vitaminu C naopak klesá obsah kyselin a pektinových látek. Různá stadia zralosti jsme schopni pozorovat čichem, chutí i zrakem.

U angreštu rozlišujeme 3 stupně zralosti:

- Zelená zralost – plody sklízíme nezralé, mají zelenou barvu a měří v průměru pod 0,1 cm. Takové plody se sbírají na konci května a slouží k přípravě ovocných salátů, pudingů atd. Sběr takových plodů je rozšířen především v Anglii a Německu, u nás se takovéto plody nesbírají.
- Kompotová zralost – sklizeň plodů probíhá na konci června. Průměrná velikost plodů je 1,5 cm, jsou tvrdé a nemají intenzivní zabarvení, zpravidla bývají světlezelené.
- Konzumní (plná) zralost – nastává začátkem července a končí koncem července. Plody mají intenzivní zbarvení odpovídající barvě odrůdy. Plody jsou vyzrálé, nejsou však přezrálé a jsou vhodné především pro přímý konzum, na výrobu vín, džemů a kompotů [12,33].

Angrešt je keříkový nebo stromkový s různým zabarvením plodu v konzumní zralosti (zelené, bílé, žluté, zlatožluté a červené). U zralých plodů se zvyšuje obsah sacharidů a snižuje množství organických kyselin. Avšak i zralé plody mají mnoho organických kyselin, např. kyselinu jablečnou a citronovou. Pro značně tuhou slupku, pecky a velké množství kyselin je angrešt nevhodný u diet šetrících trávicí trakt a u ledvinových kamenů pro obsah kyseliny šťavelové. U nezralých plodů se vyrábí želírovací prostředek Petosa a zralé jsou nejen výborným stolním ovocem, ale i vhodnou surovinou do mražených krémů, past, kompotů, rosolů a marmelád [10].

2.1.11 Biologické znaky a vlastnosti odrůd angreštu

List

Podle jeho velikosti, barvy, tvaru, počtu laloků, okraje čepele, délky řapíku a ochmýření jsme schopni rozeznávat různé odrůdy angreštu. Velikost listu se mění v závislosti na půdních podmínkách a řezu rostliny. Tvar listu závisí na velikosti laloků, listy bývají třílaločné a pětílaločné. Okraj listové čepele bývá ostře zoubkovaný, pilovitý nebo se zaoblenými zoubky. Řapík bývá různě dlouhý a ve spodní části se ojediněle vyskytují chloupky s rozdílnou délkou. Barva listu je různá od tmavě zelené až po světle zelenou a jeho povrch může být hladký, lesklý nebo matný. Na *Obrázku č. 7* můžeme vidět list angreštu [18].



Obrázek č. 7: List angreštu [30]

Květ

Velikost květu je ovlivněn výživou, řezem keře a odrůdou. Podle tvaru češule rozeznáváme odrůdy s kulatou, oválnou nebo válcovitou češulí. Barva češule může být tmavě zelená, hnědozelená nebo karmínová (viz *Obrázek č. 8*) [18].



Obrázek č. 8: Květ angreštu [31]

Plod

Odrůdy rozlišujeme podle velikosti plodů. Rané odrůdy mívají plody malé. Oproti tomu velkoplodé odrůdy mají plody až 4,5 cm dlouhé, 2,5 cm široké a dosahují hmotnosti do 20 g. Plody angreštů (viz *Obrázek č. 9*) mohou být kulaté, oválné, vejčité, hruškovité a nepravidelné.

Slupka se dokonale a intenzivně zbarvuje při dozrávání. Odrůdy se dělí do čtyř skupin podle barvy slupky na běloplodé, zelenoplodé, žlutoplodé a červenoplodé. O kvalitě plodu a jeho využití rozhoduje síla slupky, pro konzervárenství jsou vhodnější plody se silnou slupkou.

Jakost dužniny (tj. pevnost, chuť a barva) záleží na stupni zralosti a vynikne až v době úplné zralosti. Dužnina může být sladká, kyselá, aromatická, slabě aromatická i bez aroma. Barva dužniny se často shoduje s barvou slupky. U červenoplodých odrůd může být dužnina červená, žlutočervená nebo žlutozelená. U zelenoplodých je dužnina zelená a u žlutoplodých je žlutozelená nebo oranžová [18].



Obrázek č. 9: Plody angreštu [32]

2.1.12 Využití plodů pro potravinářské účely

Angrešt má v potravinářství široké uplatnění. Lze jej využít pro přípravu konzerv, kde závisí na stupni zralosti, odrůdě, barvě a velikosti. Ze zralého angreštu lze vyrobit povidla, mošt, víno. Z téměř zralého angreštu se vyrábí kompoty, džemy, marmelády a rosoly. Angreštový protlak se přidává do džemů, marmelád a rosolů vyráběných z ovoce, které obsahuje málo pektinových látek. Nezralé plody se ke konzervování nepoužívají, v kompotu by se scvrkávaly a šťávy z nich by byly kyselé, slizovité a bez vůně.

Angreštový kompot

Pro přípravu kompotu je vhodné použít zralý pevný angrešt nebo mírně nedozralé plody. Tvrdé, zralé a nepopraskané plody očistíme pod tekoucí vodou. Méně zralé plody se ještě předvaňují. Zralé plody propícháme a zalijeme horkým nálevem. Sterilizace trvá 20 – 30 minut při 85 °C [8,9].

Angreštový džem

Vyrábí se z dozrálých a intenzivně zbarvených plodů. Po odstranění stopek a oprání zalijeme dvě třetiny plodů vodou a dusíme pod pokličkou do změknutí. Měkký angrešt prolisujeme, přidáme zbytek plodů a po odpaření vody přidáme cukr. Hotový horký džem naplníme do skleniček, obrátíme dnem vzhůru a necháme vychladnout [8,9].

Angreštový rosol

Plody angreštu důkladně omyjeme, zalijeme malým množstvím vody a dusíme. Rozvařený angrešt nalijeme do plátěného sáčku a necháme odkapat. Po odpaření třetiny objemu čiré šťávy přidáme cukr a vaříme tak dlouho, až vznikne rosol. Horký rosol nalijeme do skleniček, uzavřeme a necháme vychladnout [8].

Angreštová šťáva

Šťáva z angreštu se snadno zakaluje, a proto se nepoužívá k výrobě nealkoholických výrobků. Většinou se pro výrobu nealkoholických šťáv mísí s rybízovou šťávou. Zakalení způsobují bílkoviny, které pocházejí z přezrálých a plesnivých plodů [33].

Angreštové víno

Pro výrobu stolního vína jsou vhodné zralé plody angreštu. Pro výrobu vín jsou vhodnější drobnoplodé odrůdy, důvodem je větší obsah cukru než u velkoplodých odrůd [33].

2.1.13 Situace v ČR

Produkce angreštu od roku 2003 do roku 2006 se postupně snižovala, v následujících letech se začala produkce opět zvyšovat. Produkci ovoce v roce 2010 ovlivnilo prudké ochlazení a silný déšť. Největší pokles produkce byl pozorován u angreštu a švestek.

Tabulka č. 1: Celková sklizeň vybraného ovoce v ČR (t) [34]

Ovocný druh	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Angrešt	4 046	4 009	3 568	2 092	3 087	3 201	3 326	2 837
Rybíz	13 472	20 912	15 057	11 730	15 884	17 088	16 259	13 868
Broskve	9 090	8 288	4 861	19 750	14 485	11 924	12 706	8 080
Švestky	20 626	27 817	14 187	32 901	19 042	16 127	24 211	14 135

2.2 Účinné látky obsažené v plodech angreštu

Angrešt patří mezi nejcennější ovocné druhy vzhledem k jeho obsahu vitaminů, kyselin, minerálních, aromatických a chuťových látek, ale také kvůli dietetickému a léčivému účinku. Má nízkou kalorickou hodnotu, urychluje trávení a tím znesnadňuje nadměrné ukládání tuků.

Pro angrešt je typický vysoký obsah vody. V angreštu jsou přítomny sacharidy (obvykle v množství 6 – 10 %), jejichž obsah při dozrávání obvykle stoupá. Plody nejvíce obsahují fruktózu a glukózu. Množství cukru v plodech závisí na druhu půdy a teplotě. Vzhledem k tomu, že jsou oba cukry lehce stravitelné, vykazují povzbuzující účinek pro lidský organismus [9,11].

Bobule obsahují vlákninu, ale její obsah v nich se liší, záleží však na druhu, stáří plodů a vegetačních podmínkách. Kvůli obsahu vlákniny se angrešt nedoporučuje při žaludečních

vředech, při enteritidách a zánětech tlustého střeva. Naopak je vhodný pro osoby trpící chronickou zácpou, hypertenzi nebo otylostí.

Angrešt je bohatý na pektinové sloučeniny (více je jich v nezralých plodech), umožňuje tak snadné želírování při výrobě džemů, želé a dalších výrobků. Z hlediska malého obsahu tuků a bílkovin nemá pro výživu člověka praktický význam [9,10,35].

Z hlediska výživy člověka je velmi důležitý obsah vitamínu C, který je v plodech přítomen z 95 % v redukované formě kyseliny L-askorbové. Obsah vitamínu C se zvyšuje až do ukončení růstu plodů, při zrání se poté jeho obsah snižuje až o 1 % denně. V malém množství plody obsahují vitaminy skupiny B a provitaminy skupiny A (chrání sliznice a posilují buňky). Ve větším množství se vyskytuje vitamin E, více než v červeném rybízu, pomerančích a dalších citrusových plodech [2,8,35].

Z minerálních látek obsahuje větší množství draslíku a křemíku, který zajišťuje pevnost a pružnost tkání. Mezi další klíčové živiny patří vápník, síra, sodík, železo, měď, mangan, jód a zinek. Dále obsahuje třísloviny, flavonoidy, hydroxybenzoové kyseliny, hydroxycinamové kyseliny a další organické kyseliny [2,10,36].

Z organických kyselin je v angreštu převážně kyselina citronová, už méně je jablečné, šťavelové a vinné. Kyseliny brzdí rozvoj bakterií, což se projevuje snadnějším zpracováním a uchováním. Přezrálé plody obsahují kyselinu jantarovou, a to jako volnou nebo ve formě glykosidu. Obsah kyselin závisí na odrůdě a vegetačních podmínkách. Mezi fenolové sloučeniny v angreštu patří katechiny, flavonoly a fenolové kyseliny. V tmavě zbarvených plodech je větší množství anthokyanů [9,11].

Tabulka č. 2: Chemické složení plodů angreštu [37]

Složení plodů	Obsah
Sušina [%]	13,53
Voda [%]	86,47
Nerozpustné látky [%]	3,47
Cukry jako invert [%]	6,06
Hrubá vláknina [%]	2,82
Veškeré kyseliny [%]	1,82
Hodnota pH	3,1
Popel [%]	0,45
Třísloviny [%]	0,09
Pektinové látky [%]	0,88
Glukosa [%]	1,2 – 3,6
Fruktosa [%]	2,1 – 3,9
Sacharosa [%]	0,1 – 0,6

Tabulka č. 3: Přehled energetických a nutričních hodnot ve 100 g čerstvého angreštu [37,38]

Nutriční parametry	Hodnoty ve 100 g čerstvých plodů
Energetická hodnota [kJ]	150
Bílkoviny [g]	0,90
Tuky [g]	0,50
Sacharidy [g]	10,4
Vápník [mg]	32,9
Hořčík [mg]	14
Draslík [mg]	196
Fosfor [mg]	34
Síra [mg]	12
Sodík [mg]	7
Vitamin C [mg]	32,7 – 47,5
Vitamin E [mg]	0,4
Vitamin A [mg]	0,070
Vitamin B1 [mg]	0,065

2.2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou podstatnou složkou ovoce. Bývají většinou rozpustné ve vodě, vznikají převážně v listech a zelených částech rostlin fotosyntetickou asimilací oxidu uhličitého. Obsah cukru v angreštu se liší, závisí na odrůdě, stupni zralosti, klimatu i vegetačním období. Mají významný vliv na kalorickou hodnotu ovoce, protože rozpustné cukry (glukosa, fruktosa, sacharosa) jsou lidským organismem rychle absorbovány a využívány [33].

2.2.2 Pektinové látky

Jsou velmi rozšířenou složkou všech druhů ovoce. Jedná se o vysokomolekulární sloučeniny typu polysacharidů rostlinného původu, které způsobují rosolovatění produktů. V rostlinách jsou přítomny ve formě nerozpustného protopektinu nebo pektosy. Jejich základní řetězec je tvořen obvykle 25 – 100 jednotkami D-galakturonové kyseliny. U zralých plodů dochází k přeměně protopektinu na pektin, čímž se snižuje schopnost tvořit rosol [11,33,39].

2.2.3 Vitaminy

Jsou to nízkomolekulární organické sloučeniny, které mají různé chemické vlastnosti a jsou nezbytné pro řadu biologických a fyziologických funkcí lidského organismu. Organismus si je nedovede sám syntetizovat, a proto musí být dodávány potravou. Rozdělují se obvykle podle rozpustnosti: vitaminy rozpustné ve vodě a vitaminy rozpustné v tucích. Vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K) se mohou ukládat v tukových tkáních, naopak vitaminy rozpustné ve vodě se v organismu neukládají a jejich přebytky se vylučují močí. Doporučené denní dávky vybraných vitaminů jsou uvedeny v Tabulce č. 4 [40].

Tabulka č. 4: Doporučené denní dávky vitaminů [41]

Vitaminy	Výživová denní dávka [mg · d ⁻¹]
C – kyselina askorbová	60
E – tokoferol	10
B2 – riboflavin	2,0
B1 – thiamin	1,4
A – jako β-karoten	0,8

2.2.3.1 Vitamin E

Vitamin E patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Existuje osm různých forem vitaminu E, které jsou odvozeny od tokolu a tokotrienolu. Jejich struktura se skládá s chromanového jádra a postranního řetězce. Jelikož se vitamin E vyskytuje v potravě rozpuštěný v tucích, tak jeho nedostatek může být způsoben špatným vstřebáváním tuků. Tokoferoly patří k nejdůležitějším přírodním antioxidantům, které se tvoří pouze v rostlinách. V lidském organismu působí proti volným radikálům, tak že přerušují jejich řetězovou reakci a tím chrání biomembrány před jejich oxidativním napadením. Proti účinkům volných radikálů spolupracuje se vzácným stopovým prvkem selenem, který obsahuje velmi účinný enzym glutathion-peroxidáza. Vitamin E má příznivé účinky na lidské zdraví zabraňuje srdečním a mozkovým mrtvicím, vzniku rakoviny a zvyšuje odolnost proti infekcím [10,42,43,44].

2.2.3.2 Vitamin B1 (thiamin)

Thiamin se skládá ze substituovaných jader thiazolu a pyrimidinu, které spojují methylenové můstky. Patří do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě. Thiamin se v rostlinách vyskytuje především ve volné formě a v živočišných surovinách je vázán ve formě thiamindifosfátu. V lidském organismu existuje ve dvou biologicky aktivních formách. Thiamin se podílí na metabolismu sacharidů (glykolýza, pentoso-fosfátový cyklus) a působí v nervech při aktivaci kanálů chloridových iontů. Jeho nedostatek se projevuje poruchou kardiovaskulárního aparátu nebo neurologickou poruchou [42,44,45].

2.2.3.3 *Vitamin B2 (riboflavin)*

Vitamin B2 se kládá z heterocyklického isoalloxazinového jádra, které je navázáno na alkohol ribitol. Je barevný, fluoreskuje, je termostabilní, ale rozkládá se světlem. Mohli bychom ho zařadit do skupiny flavinů a v biochemických systémech je volný anebo vázaný ve dvou aktivních formách (FMN – flavinmononukleotid, FAD – flavinadeninindinukleotid). Tyto enzymy jsou známy jako flavoproteiny a hrají důležitou roli v přenosu atomu vodíku při oxidačních procesech v buňce. Vitamin se nejvíce vyskytuje v živočišných produktech, v zelenině a ovoci se vyskytuje v nepatrném množství [42,44].

2.2.3.4 *Vitamin A (retinol)*

Patří k nejdéle známým vitaminům, jeho deficit projevující se šeroslepostí je znám již od středověku. Patří k vitaminům rozpustných v tucích. Z chemického hlediska jde o alkohol, který obsahuje šestičlenný β -jonový kruh s navázaným bočním řetězcem složeným ze dvou isoprenoidních jednotek. Je přijímán přímo z potravy nebo ve formě provitaminu – žlutého pigmentu β -karotenu. Oxidací vzniká 11-cis-retinal, který je součástí fotorecepčního pigmentu tyčinek oční sliznice. Vitamin A se strukturně podobá karotenoidům, v přírodě jsou stovky karotenoidů a jen 50 z nich se mohou přeměnit na vitamin A. Nedostatek vitaminu A způsobuje poruchy, které se mohou projevovat špatným viděním za šera [40,42,44].

2.2.4 *Minerální látky*

Všechny minerální látky jsou anorganického původu a to znamená, že organismus si je není schopen vyprodukovat. Rostliny čerpají minerální látky z půdy a člověk z potravy. Jsou nepostradatelné pro lidský organismus, jako součást koenzymů katalyticky působících na řadu biochemických procesů. Hrají důležitou roli při stavbě kostí, zubů a jsou důležité pro dobrou funkci ledvin. Lidské tělo obsahuje přibližně 25 nezbytných minerálů, k nejdůležitějším patří draslík, hořčík, sodík a vápník. V *Tabulce č. 5* vidíme doporučené denní dávky vybraných minerálních látek [10,46].

Tabulka č. 5: Doporučené denní dávky minerálních látek [41]

Minerální látky	Výživová denní dávka [mg · d⁻¹]
Sodík	2500
Draslík	2000
Fosfor	800
Vápník	800
Síra	500
Hořčík	300
Železo	14

2.2.4.1 Sodík

Sodík se v těle vyskytuje převážně v kostech, část ho najdeme i v tělních tekutinách, nervech a svalech. Spolu s draslíkem udržují acidobazickou rovnováhu v těle, určují množství vody ve tkáních a udržují osmotický tlak. Poměr mezi sodíkem a draslíkem by měl být 1:2. Nadměrné používání kuchyňské soli způsobuje vysoký příjem sodíku, ten je však odstraněn ledvinami. Při poškození ledvin nebo nemoci dochází k hromadění sodíku v těle a tím se snižuje množství draslíku, což vede k vysokému krevnímu tlaku a zadržování tekutin [45,46].

2.2.4.2 Draslík

Je to třetí nejčastěji se vyskytující minerál v lidském těle. Je důležitý pro normální funkci svalů a nervů, pomáhá zajišťovat rovnováhu tělesných tekutin a spolu se sodíkem udržují acidobazickou rovnováhu v těle. Je důležitou součástí metabolismu sacharidů a metabolismu kyslíku v krvi. Při nadměrném stresu dochází k jeho ztrátě, a proto jej musíme přijímat více [10,46].

2.2.4.3 Vápník

Je to nejrozšířenější minerál v našem těle a tvoří přibližně 1,5 – 2,0 % z celkové tělesné váhy. Najdeme ho především v kostech a zubech. Spolu s hořčíkem se podílí na normální srdeční činnosti a krevním oběhu. Je důležitý pro sekreci inzulínu, srážení krve a pomáhá správnému fungování nervového systému. Nedostatek vápníku způsobuje osteomalacii a osteoporózu (řidnutí kostí) [10,45].

2.2.4.4 Hořčík

V lidském těle se většina hořčíku vyskytuje v kostech, v menším množství se pak vyskytuje ve svalech, játrech, mozku a krvi. Působí společně s vápníkem a správný poměr mezi oběma minerály by měl být 1:2 (1 díl hořčíku na 2 díly vápníku). Vápník hraje důležitou roli při přeměně krevního cukru na energii, je nezbytný pro zdravé srdce, kosti a zuby. Je nepostradatelný pro funkci hypofýzy a zabraňuje svalovým křečím [45,46].

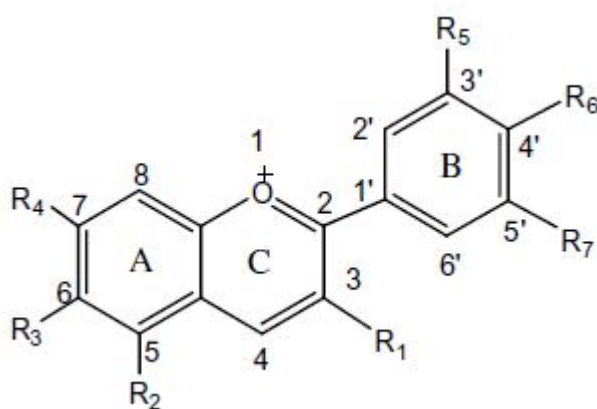
2.3 Anthokyany

Anthokyany, nazývané též anthokyaniny, jsou skupinou sloučenin patřící do mnohem rozsáhlejší skupiny rostlinných fenolů a tím jsou flavonoidy. Tvoří nejrozšířenější skupinu rostlinných pigmentů rozpustných ve vodě, které jsou zodpovědné za zbarvení ovoce, zeleniny, obilovin, květů a bylin. Dávají jednotlivým částem rostlin červenou, růžovou, purpurovou, modrou či fialovou barvu, což vysvětluje jejich jméno (v řečtině anthos znamená květ a kyanos znamená modrý). Tyto barvy přitahují hmyz a ptáky, čímž dochází k zefektivnění opylení květů a rozšiřování semen. Odhaduje se, že zatím bylo nalezeno v přírodě více než 400 anthokyanů.

Další významnou vlastností anthokyanů je jejich antioxidační aktivita (likviduje volné radikály), která hraje důležitou roli v prevenci nervových a kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a cukrovky. Vzhledem k obrovskému potenciálu přírodních anthokyanů roste zájem o vývoj analytických technik pro jejich separaci, identifikaci v rostlinách, sledování barevné a pigmentové změny, biosyntézu a kvantitativní analýzu pomocí chromatografických technik [47,48,49,50,51].

2.3.1 Struktura a názvosloví

Z chemického hlediska se jedná o heteroglykosidy, které se skládají z cukerné složky a anthokyanidinu. Anthokyanidiny jsou deriváty polyhydroxysloučenin a polymethoxylované deriváty 2-fenylbenzopyryliového nebo také flavyliového kationtu (Obrázek č. 10).



Obrázek č. 10: Základní struktura anthokyanů [51]

V přírodě se vyskytuje celkem 17 významných anthokyanidinů, které jsou uvedeny v *Tabulce č. 6*. Hlavními rozdíly mezi nimi jsou různá množství hydroxylových skupin, odlišná povaha a množství navázaných cukrů na jejich strukturu. Dále také odlišné alifatické nebo aromatické karboxyláty vázané na cukr v molekule a polohy těchto vazeb.

Z anthokyanidinů uvedených v *Tabulce č. 6* má v potravinách význam pouze šest z nich s navázanou hydroxyskupinou v poloze C3. Jsou to pelargonidin (Pg), peonidin (Pn), kyanidin (Cy), malvidin (Mv), petunidin (Pt) a delphinidin (Dp).

V přírodě se nejvíce vyskytují glykosidy tří nemethylovaných anthokyanidinů (Cy, Dp a Pg), vyskytují se v listech (80 %), v ovoci (69 %) a květech (50 %). Rozdělení šesti nejběžnějších anthokyanidinů v jedlých částech rostlin je Cy (50 %), Pg (12 %), Pn (12%), Dp (12 %), Pt (7 %) a Mv (7 %). Mezi v přírodě nejrozšířenější glykosidové deriváty patří 3-monosidy, 3-biosidy a 3,5-diglykosidy. Mezi nejčastěji se vyskytující anthokyanové pigmenty patří kyanidin-3-glukosid [47,48,51].

Tabulka č. 6: Přehled významných anthokyanidinů [48]

Název	Zkratka	Substituent v poloze						
		3	5	6	7	3'	4'	5'
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H
Aurantidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
6-Hydroxycyanidin	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
Luteolinidin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
5-Methylcyanidin	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Pukhellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH

Vysoká reaktivita anthokyanidinu zodpovídá za strukturní modifikace anthokyanů a za širokou škálu zbarvení. Samotná cukerná složka nebo typ její acylace má nepatrný účinek na změnu struktury. Cukernou složku anthokyanů představuje 5 sacharidů: D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa, D-xylosa a L-arabiosa. Sacharidy jsou vždy vázány na C3, ztráta cukerné složky v této poloze je doprovázena rychlým rozpadem anthokyanidinu, což způsobuje nevratnou ztrátu barvy. Na základě počtu vázaných molekul cukru, můžeme anthokyanidy rozdělit do 18 skupin a mezi nejvýznamnější patří: [47,52]

- Monosidy s glukosou, galaktosou, rhamnosou nebo arabiosou v poloze C3 (3-monosidy).
- Biosidy s disacharidy (např. Rutinosa, sambubopsa, soforosa) vázanými v poloze C3 (3-biosidy).
- Triosidy s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy vázanými v poloze C3 (3-triosidy).

2.3.2 Výskyt

Anthokyaniny jsou v přírodě velmi rozšířené, vyskytují se v mnoha druzích rostlin. Mezi hlavní zdroje anthokyanů patří rostliny čeledi révovitých (hrozny vinné révy) a růžovitých (třešně, švestky, maliny, ostružiny, jahody, jablka). Další potravinářské významné rostliny s obsahem anthokyanových barviv patří do čeledi lilkovitých (lilek, brambor), lomikamenovitých (černý a červený rybíz, červené odrůdy angreštu) a brukvovitých (červené zelí). V Tabulce č. 7 jsou uvedeny zdroje anthokyanů a hlavní anthokyanová barviva, která obsahují. Angrešt obsahuje především kyanidin 3-glukosid a kyanidin 3-rutinosid, evropské druhy angreštu se liší od těch amerických, které navíc obsahují i delfinidin glykosidy [47,53].

Tabulka č. 7: Hlavní anthokyaniny ve vybraných druzích ovoce [47]

Český název	Latinský název	Hlavní anthokyanová barviva *
Angrešt	<i>Ribes grossularia</i>	Cy 3-glukosid a 3-rutinosid
Banán	<i>Musa sapientum</i>	Žluté 3-deoxyanthokyanidiny
Bezinky	<i>Sambucus nigra</i>	Cy 3-sambubiosid, 3,5-diglukosid
Jahoda	<i>Fragaria</i> sp.	Pg a Cy 3-glukosidy
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Pn 3-galaktosid
Moruše	<i>Morus nigra</i>	Cy 3-glukosid
Rybíz černý	<i>Ribes nigrum</i>	Cy a Dp 3-glukosidy, 3-diglukosidy
Rybíz červený	<i>Ribes rubrum</i>	Cy 3-glukosid, 3-rutinosid, 3-sambubiosid
Švestka	<i>Prunus domestica</i>	Cy a Pn 3-glukosidy, 3-rutinosidy

* Cy = kyanidin, Pg = pelargonidin, Pn = peonidin, Dp = delphinidin

2.3.3 Použití anthokyanů

V současnosti je stále větší zájem o přírodní barviva, hlavně díky toxickým účinkům syntetických barviv. Mezi nejvyužívanější potravinářská barviva patří karotenoidy a anthokyaniny. Karotenoidy jsou rozpustné v tucích, stabilní a slouží k barvení potravinářských výrobků v rozmezí barev od žluté až po červenou. Anthokyaniny patří mezi barviva rozpustná ve vodě, izolují se buď z rostlin, nebo se k barvení používají přímo zahuštěné šťávy. Jelikož mají nejvíce intenzivní barvu v prostředí o pH menším než 3,5 používají se jen v kyselých potravinách. V současnosti je průmyslově využíváno k výrobě anthokyanů jen několik rostlinných druhů, vzhledem k omezené dostupnosti a ekonomickým podmínkám. K nejčastěji používaným anthokyanovým barvivům patří anthokyaniny získané z hroznů vinné révy, z plodů černého bezu nebo z plodů aronie [47,51].

2.3.4 Faktory ovlivňující stabilitu anthokyanů

K nejdůležitějším vlastnostem anthokyanů patří barva a její stabilita. Izolované anthokyaniny jsou vysoce nestabilní a jsou náchylné k degradaci. Jejich stabilita je ovlivněna několika faktory jako je struktura molekuly, pH, teplota při skladování, koncentrace, světlo, přítomnost kyslíku a některých enzymů.

Anthokyaniny jsou vysoce reaktivní a snadno se degradují. Podmínky skladování hrají důležitou roli v udržení pigmentů. Anthokyaniny by se měly skladovat v chladném a tmavém prostředí, jelikož sluneční záření a vysoké teploty způsobují ztrátu pigmentace [47,51]

Rozpouštědla a koncentrační účinky anthokyanů

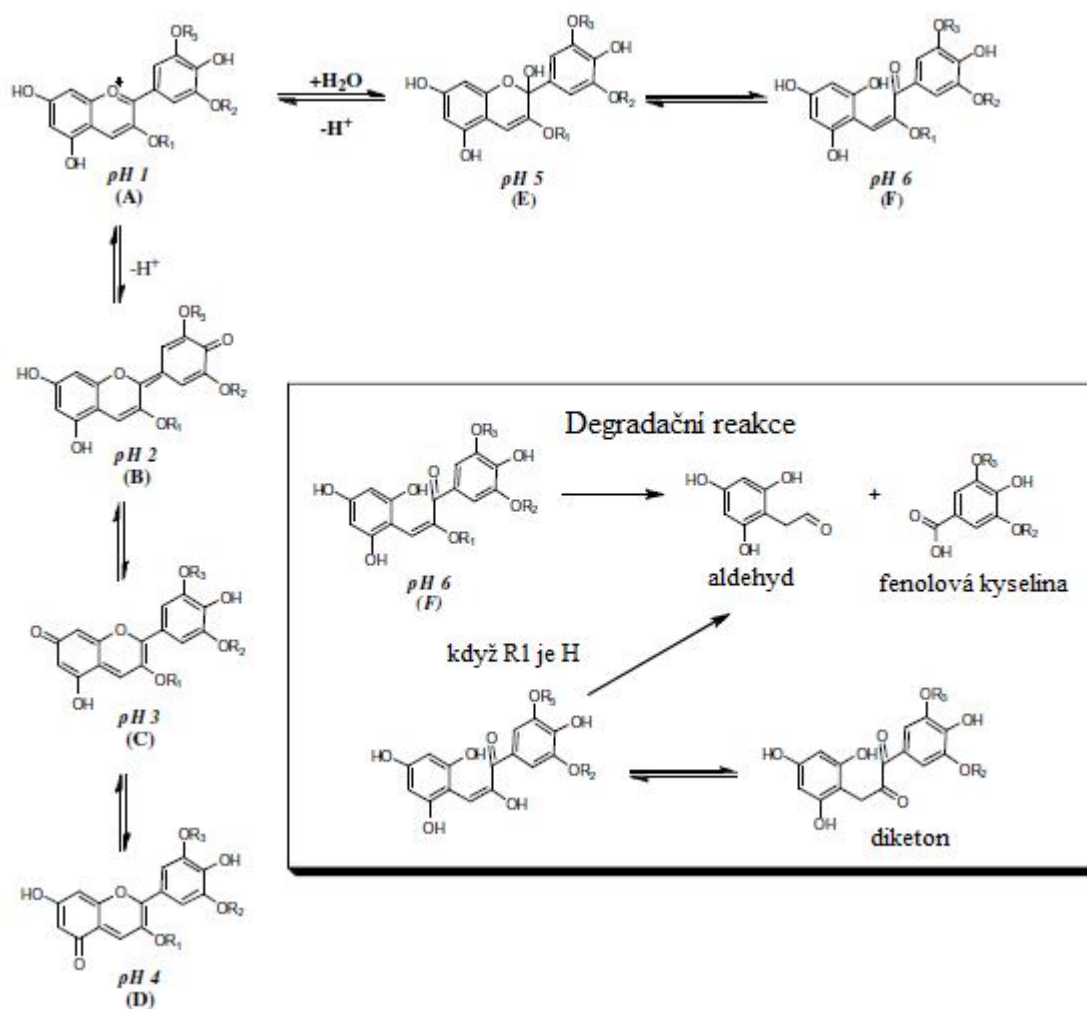
Výzkumu se syntetickými flavyliovými solemi v různých roztocích dokázaly, že změna barvy závisí na rozpouštědle a na koncentraci flavyliových solí. V protických rozpouštědlech (např. alkoholy) má flavyliová sůl červené zbarvení, zatímco v aprotických rozpouštědlech (např. aceton, dioxan) má žlutou barvu. Červená barva odpovídá monomeru a žlutá barva odpovídá dimeru, a při zvyšování koncentrace flavyliových solí dochází k zesílení červené barvy.

Také bylo zjištěno, že při zvyšování podílu vody, ve směsi vody a acetonitrilu dochází k přeměně monomeru na zeleně zbarvený dimer. Z toho vyplývá, že voda hraje zásadní roli v dimerizaci flavyliových solí [51].

2.3.4.1 Vliv pH prostředí

Anthokyany existují v různých chemických formách, které jsou závislé na hodnotě pH prostředí. (Obrázek č. 11). V kyselém prostředí při pH 1 dominuje flavyliový kation (červená barva) a přispívá tak k fialové a červené barvě (Obrázek č. 11, A). V rozmezí hodnot pH 2 – 4 převládají chinoidní modré báze. Při zvyšování hodnoty pH na 5 – 6 lze pozorovat bezbarvou karbinolovou pseudobázi (Obrázek č. 11, E) a bezbarvý chalkon (Obrázek č. 11, F). Při hodnotách pH vyšších než 7 dochází k degradaci anthokyanů v závislosti na jejich substitučních skupinách (Obrázek č. 11, degradační reakce). V rozmezí hodnot pH 4 – 6 se vyskytují společně 4 strukturní formy anthokyanů je to flavyliový kation, bezvodá chinoidní báze, bezbarvá karbinolová báze a světle žlutý chalkon. Rovnováhu mezi chinoidní a karbinolovou bází zajišťuje flavyliový kation, jak je znázorněno na Obrázku č. 11 (D, A, E).

Stabilita anthokyanidinů je ovlivněna substituenty na B kruhu a na přítomnost dalších hydroxylových nebo methoxylových skupin, které snižují stabilitu anthokyanidinů v neutrálním prostředí. Nejstabilnějším anthokyanidinem je proto pelargonidin. Můžeme vyvodit závěr, že změna barvy anthokyanů, vzhledem k jejich nestabilitě, je mnohem významnější v alkalické oblasti [50,51].



Obrázek č. 11: Chemická forma anthokyanů závisí na pH a degradační reakce na anthokyanech [51]

2.3.4.2 Kopigmentační efekt

Anthokyany mají schopnost tvořit slabé komplexy s bezbarvými organickými rozpouštědly nebo s kovovými ionty. Tento jev je v potravinářství považován za velmi důležitý, protože barva je jedním z hlavních faktorů kvality. Můžeme říci, že kopigmentace anthokyanů s jinými sloučeninami (kopigmenty) je hlavním mechanismem stabilizace barvy v rostlinách. Kopigmenty obsahují mnoho π -elektronů, které jsou schopny se vázat na flavyliový ion, který obsahuje málo elektronů. Toto spojení poskytuje ochranu před nukleofilním atakem vody, který napadá flavyliový ion v poloze 2 a také proti ostatním sloučeninám (peroxydy, oxid siřičitý), které se vážou na flavyliový ion v poloze 4. Kopigmenty jsou obvykle bezbarvé, ale vznikem komplexu s anthokyany se zvyšuje stabilita zbarvení chromoforu a dochází také k bathochromnímu posunu v hodnotě absorpčního maxima ve viditelné části spektra.

Kopigmenty mohou být flavonoidy, alkaloidy, aminokyseliny, organické kyseliny, nukleotidy, polysacharidy, kovy nebo jiné anthokyany. Interakce anthokyanů s kopigmenty může probíhat pěti různými způsoby v závislosti na druhu interagující sloučeniny. V případě kopigmentace s jiným anthokyanem se jedná o intramolekulární kopigmentaci, u kovu

se jedná o komplexotvornou reakci. Spojením s kopigmentem obsahujícím volný elektronový pár probíhá intermolekulární kopigmentace, u nejsložitější kopigmentace dochází ke spojení s aglykonem, cukrem, kopigmentem a protony ve stejnou dobu. Pokud je kopigmentem jiná fenolická sloučenina pak je interakce přechodná, kvůli nedostatku chemických vazeb.

Celková kopigmentace je založena na dvou efektech:

- Tvorbě π - π komplexu, způsobující změny spektrálních vlastností flavyliového iontu, zvyšuje se intenzita absorpce a jeho vlnová délka (bathochromní posun).
- Stabilizaci flavyliové formy π - π komplexem.

Rozsah kopigmentačního účinku je závislá na pH, protože při nízkých hodnotách pH jsou všechny molekuly anthokyanů ve flavyliové formě a při vysokých hodnotách pH jsou ve formě bezbarvé karbinolové pseudobáze. Kopigmentační efekt je patrný za slabě kyselých podmínek (pH 4 – 6), kde jsou anthokyany ve své bezbarvé formě [47,51].

2.3.4.3 Tvorba kovových komplexů

Různé barvy květů jsou způsobeny tvorbou chelátů mezi kovem a flavyliovou soli. I přes nízký zájem v potravinářském průmyslu, vykazují komplexy anthokyanů s kovy stabilizační účinek na anthokyany a jejich zabarvení. Komplex s kovy mohou vytvořit pouze anthokyany s navázanou hydroxylovou skupinou v *ortho*-poloze na B kruhu (Cy, Dp, Pt). Z některých studií o stabilitě barev v rostlinách vyplývá, že modrá barva vzniká tvorbou komplexů anthokyanů s kovy jako je hliník, železo, cín, měď a hořčík. Tyto kovové komplexy způsobují bathochromní posun z červené barvy do modré.

Kovové ionty mohou také působit jako katalyzátory při oxidativním rozkladu anthokyanů. Patří zde zejména ionty železa, mědi, kobaltu a manganu. Tyto ionty se mohou podílet na oxidaci fenolických sloučenin, které obsahují dvě hydroxylové skupiny v *ortho*-poloze. Vznikají tak hnědé polymerizační produkty [51,52].

2.3.4.4 Účinek kyseliny L-askorbové

Bylo prokázáno, že na degradaci anthokyanových barviv se podílí synergický účinek kyseliny L-askorbové a kyslíku. K největším ztrátám anthokyanových barviv dochází při současné oxidaci kyseliny L-askorbové. Pokud bychom zajistili lepší stabilitu kyseliny L-askorbové, snížil by se tak rozklad anthokyanových barviv. Rozklad barviv způsobují degradační produkty vznikající při oxidačně-redukčních reakcích, jsou nestabilní a rozkládají se až na bezbarvé produkty [52].

2.3.4.5 Účinek kyslíku a peroxidů

Mezi největší urychlovače rozkladu anthokyanových barviv patří kyslík a teplota. Kyslík působí negativně na anthokyany přímými oxidačními mechanismy nebo prostřednictvím již zoxidovaných složek, které spolu s anthokyany vytváří bezbarvé nebo hnědé produkty. Během oxidace kyseliny L-askorbové vzniká peroxid vodíku, který způsobuje destrukci anthokyanových pigmentů [52].

2.3.5 Metody stanovení anthokyanů

Celý proces analýzy se skládá z počáteční extrakce anthokyanů z rostlinných tkání, izolace, purifikace a nakonec ze samotné identifikace jednotlivých anthokyanů. Anthokyanany jsou látky rozpustné v polárních rozpouštědlech, z rostlinných materiálů se proto extrahují prostřednictvím methanolu obsahujícím malé množství kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny mravenčí. Tyto kyseliny snižují hodnotu pH roztoku a zabranují tak degradaci anthokyanů. Mezi vhodná rozpouštědla také patří etanol, aceton a voda. Postupy extrakce bývají neselektivní a společně s pigmentem se získává celá řada vedlejších produktů (např. cukry, alkoholy, pektin, organické kyseliny, aminokyseliny a proteiny). Některé z těchto nečistot mohou urychlovat degradaci anthokyanů nebo způsobují problémy v dalších krocích zpracování. Pro přečištění se proto používá metoda extrakce na tuhé fázi (SPE – solid phase extraction), díky níž se zbavíme nečistot [48,54,55].

2.3.5.1 Historické chromatografické metody

Dříve se k separaci anthokyanů využívala papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). S rozvojem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CE) se zmenšil zájem o tyto metody. Papírová chromatografie byla jedna z prvních metod pro separaci jednotlivých anthokyanů, avšak byla časově velmi náročná a kvantifikace byla obtížná. Později byla zavedena TLC, která měla některé výhody oproti PC (např. kratší doba eluce, menší spotřeba anthokyanové směsi, lepší rozlišení). Obě tyto metody však neumožňují získat velké množství čistých anthokyanů. I přes své nedostatky se PC a TLC stále používají jako běžné techniky v mnoha laboratořích [56,57].

2.3.5.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) dělí látky na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Její výhodou je malá spotřeba chemikálií a rozpouštědel, vysoká účinnost separace a nízká spotřeba vzorku. Nejběžnější metodou pro separaci anthokyanů je kapilární zónová elektroforéza (CZE), migrace látek závisí na vzájemném poměru náboj/velikost. Separace probíhá v křemenné kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do základního elektrolytu, který obsahuje platinové elektrody pro připojení vysokonapěťového zdroje. Zóny separovaných látek se registrují UV-VIS detektorem při 599 nm, vzhledem k modré chinoidní bázi. Další metodou stanovení je micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Rozdělení látek skládajících se z nenabitých anthokyanů v neutrálním prostředí, mezi vodnou fází a micelární pseudobází [57].

CE s hmotnostní detekcí

Běžně používaným detektorem v kapilární elektroforéze je spektrofotometrický (UV-VIS), ale roste význam hmotnostního detektoru. Použitím CE/MS kombinujeme dobrou separaci CE se silou MS k identifikaci anthokyanů. Bez ohledu na velký počet ionizačních technik v hmotnostní spektrometrii se v CE/MS používá elektrosprej (ESI) [57].

2.3.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V současnosti je velice rozšířená pro kvalitativní a kvantitativní analýzu anthokyanů vysokoúčinná kapalinová chromatografie především díky její rychlosti a citlivosti. HPLC se také používá pro identifikaci jednotlivých přírodních látek v rostlině většinou ve spojení s UV-VIS detekcí, s hmotnostní detekcí nebo s detekcí nukleární magnetické rezonance.

Většina část metod izolace anthokyanů obvykle běží na koloně s reverzní fází, jako je oktadecylsilikagel (ODS) nebo polystyren. Metody HPLC mají tendenci využívat systémy rozpouštědel acetonitril-voda nebo methanol-voda s malým množstvím kyseliny pro snížení pH roztoku a zvýšení stability anthokyanů. Chceme-li získat reprodukovatelné výsledky, musíme kontrolovat pH mobilní fáze a teplotu kolony kvůli nestabilitě anthokyanů. Pro dosažení optimálních výsledků se používají kyselé mobilní fáze (pH nižší než 2,0), anthokyanů tak jsou ve stabilnější flavyliové formě. V chromatografii s reverzní fází, retenční čas klesá se zvyšující se polaritou, která odpovídá rostoucímu počtu hydroxylových skupin na flavyliovém iontu. V kyselém prostředí má flavyliový kation červenou barvu a poskytuje absorpční maximum v okolí 520 nm. Systémy s normální fází, nebo ty, které používají nemodifikovaný silikagel nejsou příliš účinné pro oddělení anthokyanů díky polaritě těchto sloučenin [48,57].

HPLC s UV detekcí

Nejčastěji používanou detekční metodou v HPLC je UV-VIS spektrometrie. Anthokyanů mají jedinečné absorpční maximum při 520 nm, díky kterému můžeme stanovit tyto sloučeniny na rozdíl od jiných flavonoidů v rostlinném extraktu. UV-VIS spektrometrie byla použita k identifikaci anthokyanů, až po zavedení technologie diodového pole. Spektrální vlastnosti určitého anthokyanu jsou spojeny s hydroxylací aglykonu. Anthokyanů s jednou okysličenou pozicí na B-kruhu (pelargonidin) dává absorpční maxima při 520 nm, zatímco di-okysličený anthokyanidin (kyanidin, peonidin) má absorpční maximum při 535 nm a tri-okysličený (delfinidin, petunidin a malvidin) dává maximum při 544 nm [57].

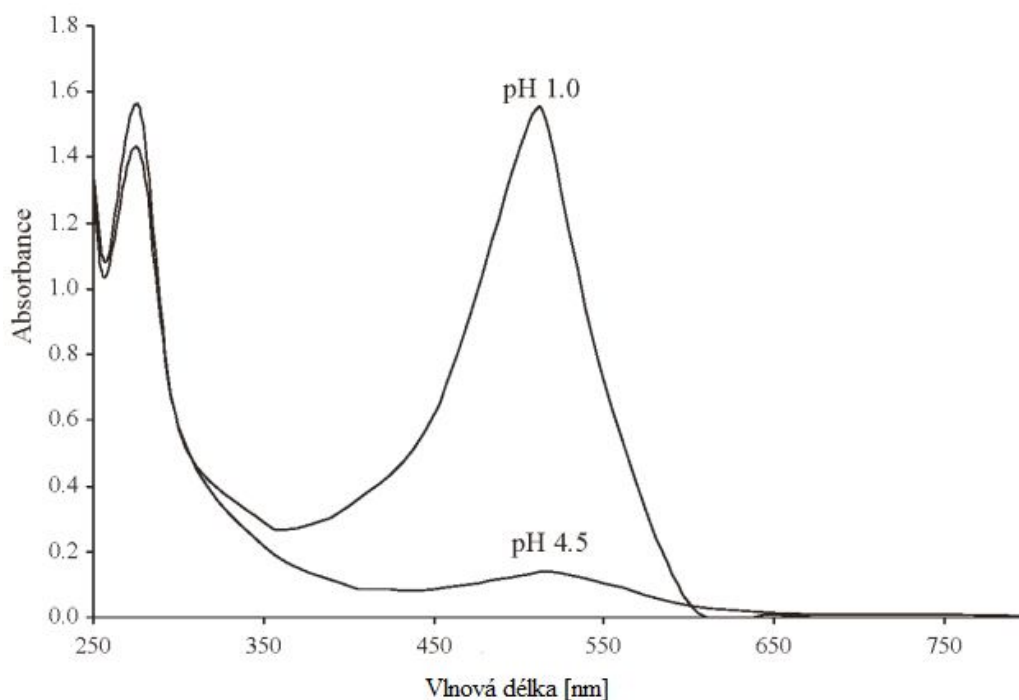
HPLC s MS detekcí

Spojení HPLC s hmotnostní detekcí má významný vliv na kvantitativní a kvalitativní stanovení anthokyanů. Tato kombinace spojuje separační výhody kapalinové chromatografie s identifikačními výhodami hmotnostní spektrometrie. MS je velmi senzitivní metoda molekulární analýzy díky její separaci podle hmotnosti, dobrou selektivitou můžeme identifikovat jednotlivé sloučeniny ve směsi sloučenin. Analýza specifických typů sloučenin vyžaduje vybrat vhodnou ionizační techniku pro zavedení molekulárních iontů do přístroje.

Mezi nejvhodnější ionizační techniky pro anthokyany patří ionizace nárazem urychlených atomů (FAB), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a ionizace pomocí elektrospreje (ESI). Nejčastěji se používá ESI, je to měkká ionizační technika a je vhodná pro malé rostlinné metabolity, jako jsou anthokyany [57].

2.3.5.4 pH diferenciální metoda

Anthokyany reverzibilně mění barvu se změnou pH, což omezuje jejich efektivní využití jako potravinářských barviv pro řadu aplikací, ale také lze snadno měřit celkovou koncentraci pigmentu. Reverzibilní změna barvy se projevuje nápadně odlišnou absorbancí (Obrázek č. 12). Vzorky se ředí vhodnými pufrů o pH 1 a o pH 4,5. Při pH 1 převládá barevná oxoniová forma a při pH 4,5 bezbarvá hemiketalová forma. Rozdíl absorbance mezi oběma tlumivými roztoky představuje celkový obsah monomerních anthokyanů. Polymerní anthokyany a pigmenty neenzymového hnědnutí nevykazují reverzibilní chování a proto nemají rušivý vliv na výpočet monomerních anthokyanů. Při výpočtu se využívá molekulová hmotnost a molární extenční koeficient hlavního anthokyanu v matrici. Počet anthokyanů, pro které byly stanoveny molekulové extenční koeficienty je však omezený [58,59].



Obrázek č. 12: UV-VIS spektra anthokyanů při pH pufrů 1,0 a 4,5 [60]

2.4 Fenolické látky

Fenolické látky (jinak zvané též rostlinné fenoly či polyfenoly) tvoří jednu z nejpočetnějších a všude přítomných skupin rostlinných metabolitů a jsou nedílnou součástí lidské stravy.

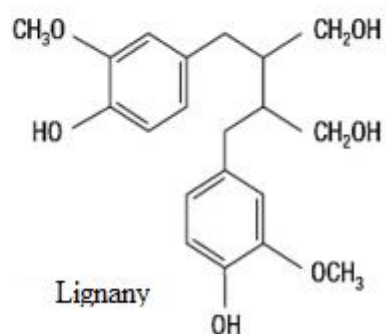
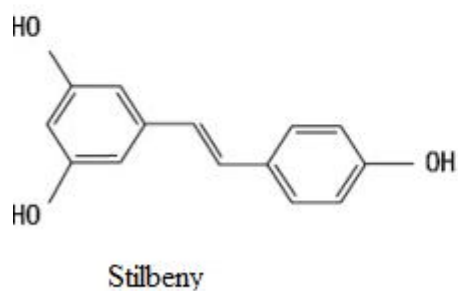
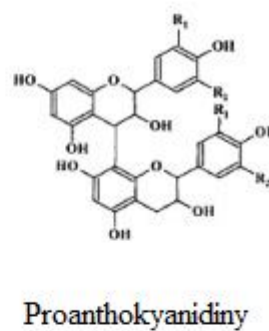
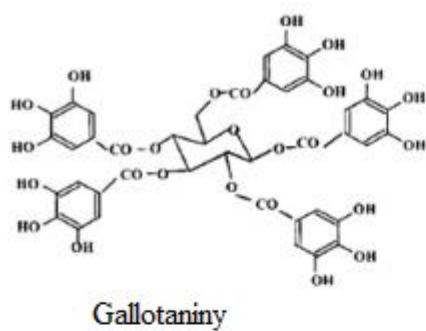
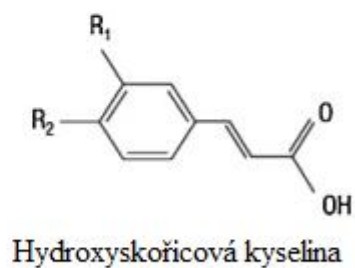
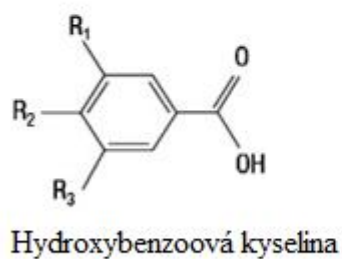
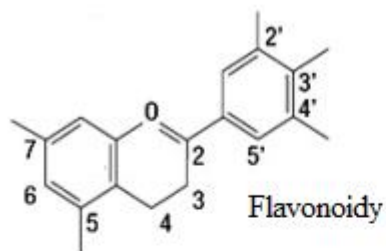
Zájem o rostlinné polyfenoly se v poslední době zvýšil, vzhledem k jejich antioxidačním účinkům a jejich možným pozitivním účinkům na lidské zdraví. Jsou to látky hrající důležitou roli při ochraně lidského těla před oxidačním stresem, který způsobuje řadu onemocnění např. zánět, kardiovaskulární onemocnění a rakovinu. Fenolické látky dávají rostlinám specifické vlastnosti, zlepšují trvanlivost dřeva, vzhled, vůni a jsou příčinou barevnosti květů. Podílejí se na růstu, rozmnožování a poskytují odolnost proti patogenům a predátorům (chovají se jako fytoalexiny nebo zvyšují trpkost potravin). Jednotlivý obsah polyfenolů v rostlinách se liší, proto byly studovány pro taxonomické účely nebo pro určení falšování potravin [61,62].

2.4.1 Chemie fenolických sloučenin

Fenolické sloučeniny neboli polyfenoly tvoří jednu z nejpočetnějších a široce rozšířených skupin látek v rostlinné říši. V současnosti je známo více než 8 000 fenolických struktur. Fenolické sloučeniny patří mezi sekundární rostlinné metabolity, které jsou důležité pro určení sensorické a nutriční kvality ovoce, zeleniny a dalších rostlin. Tyto sloučeniny obsahují aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin. Škála fenolických látek je velice široká od jednoduchých fenolů s jedním aromatickým kruhem, až po velké a složité molekuly, jakými jsou např. třísloviny a zejména lignin. Hydroxylované skupiny se mohou oxidovat, methylovat nebo konjugovat s dalšími fenolickými látkami [50,62].

Vyskytují se především v konjugované formě obsahující jeden nebo více cukerných zbytků, které jsou spojeny s hydroxylovými skupinami. Připojené cukry mohou být přítomné jako monosacharidy, disacharidy a oligosacharidy. Glukosa patří mezi nejběžnější cukernatý zbytek, mezi další patří i galaktosa, rhamnosa, xylosa a arabinosa. Běžné je také spojení s karboxylovými a organickými kyselinami, aminy, lipidy a jinými fenoly [63].

Polyfenoly rozdělujeme do několika tříd (viz *Obrázek č. 13*) v závislosti na počtu fenolových kruhů. Mezi hlavní skupiny polyfenolů patří: flavonoidy, fenolové kyseliny, taniny (hydrolyzovatelné a kondenzované), stilbeny a lignany. Mezi nejběžnější hydroxyskořicové kyseliny patří *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová kyselina a mezi hydroxybenzoové kyseliny patří *p*-hydroxybenzoová, protokatechová a syringová kyselina. Hydroxyskořicové kyseliny se v potravinách vyskytují ve formě jednoduchých esterů, zatímco hydroxybenzoové kyseliny se vyskytují ve formě glykosidů [64,65].



Obrázek č. 13: Chemické struktury hlavních tříd fenolických sloučenin [63]

Fenolické látky se rozdělují také podle biosyntézy. Vznikají v jedné ze dvou hlavních drah vedoucích ke tvorbě aromatických sloučenin v rostlinách:

1. Nejčastěji vznikají přes šikimáty (kyselinu šikimovou). Jejich syntéza vede od monosacharidů k aromatickým aminokyselinám (L-fenylalaninu, L-tyrosinu), pak následuje deaminace a tvorba kyseliny skořicové a jejích derivátů (např. kumariny, lignany, ligniny).
2. Méně často vznikají polyacetátovou biosyntézou, která začíná acetátem a vede k tvorbě ketoesterů, vyžadující cyklizaci (Claisenovou či aldolovou kondenzací). Produktem jsou polycyklické sloučeniny (např. chromony, apsidy, xantiny, chinony).
3. Kombinace obou drah je zodpovědná za biosyntézu xantinů, stilbenů, flavonoidů a isoflavonoidů [50,64].

2.4.2 Aplikace fenolických sloučenin

Polyfenoly mají několik průmyslových aplikací, používají se např. při výrobě nátěrových hmot, papíru a kosmetických přípravků. V potravinářském průmyslu se používají jako doplňkové látky (přírodní barviva a konzervační látky). Některé fenolické sloučeniny, jako jsou flavonoidy, se aplikují jako antibiotika a působí proti průjmům, vředům a zánětům. Lze je použít i pro léčbu vysokého krevního tlaku, alergií a hypercholesterolemie. Mezi hlavní fenolové sloučeniny, které se vyskytují v potravinách a krmivech patří např. kyselina benzoová, kyselina skořicová, flavonoidy a lignany [61].

2.4.3 Metody stanovení fenolických sloučenin

Některé fenolické látky jsou viditelné přímo (např. anthokyaniny z květů), jiné jsou viditelné až po ozáření UV světlem, nebo je lze detekovat různými barevnými reakcemi. V ethanolovém extraktu se obtížně barevně dokazují kvůli přítomnosti četných interferujících látek. Ke kvantitativnímu stanovení celkového obsahu fenolických látek v alkalickém extraktu se využívá měření absorbance při specifických vlnových délkách.

Pro identifikaci hlavních skupin fenolických látek, které se nacházejí v alkoholickém extraktu, se používá papírová chromatografie. Lze ji kombinovat s chromatografií na tenké vrstvě (TLC), převážně pro stanovení produktů kyselé hydrolýzy. Jednoduché fenolické látky lze identifikovat plynovou chromatografií (GC) i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), kde není potřeba derivatizace. Těmito metodami lze oddělit cis a trans izomery skořicových kyselin a glykosidy jednoduchých fenolických látek. Metodou HPLC lze identifikovat a kvantifikovat rostlinné flavonoidy. Chromatografické stanovení je velmi přesné a spolehlivé, ale je velmi problematické identifikovat všechny fenolické sloučeniny v rostlinném materiálu.

Koncentraci fenolických sloučenin lze stanovit chemickými metodami využívající redoxní reakce vazby iontů kovů. Mezi nejvíce používané patří spektrofotometrické metody, protože jsou snadno proveditelné, rychlé a jsou použitelné v laboratoři [50,66,67].

2.4.3.1 Folin-Ciocalteuova metoda

Analýza celkových polyfenolů Folin-Ciocalteuovou metodou je velmi jednoduchá, pohodlná, a vyžaduje pouze běžné vybavení. Výsledky se vyjadřují v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny gallové. Polyfenoly v rostlinných extraktech reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého komplexu, který může být kvantifikován pomocí VIS spektrometrie. Modře zbarvený komplex má maximální absorpci v oblasti od 750 nm. Folin-Ciocalteuovo činidlo je tvořeno z kyseliny fosfowolframové ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) a fosfomolybdenové ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), které se po oxidaci polyfenoly redukují na směs modrých oxidů wolframu (W_8O_{23}) a molybdenu (Mo_8O_{23}) [67,68].

2.4.3.2 Price-Butlerova metoda

V této metodě dochází k oxidaci aniontu fenolátu na radikál fenolátu a současně dochází k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželesnatan za vytvoření modrého zbarvení (berlínská modř). Touto metodou mohou vznikat interference nefenolických látek, což může způsobovat nepřesné stanovení celkové koncentrace fenolických látek [50,69].

2.4.3.3 Další metody

V posledních letech se ke stanovení fenolických látek používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s coulometrickým detektorem. Coulometrická detekce s polem speciálních elektrochemických elektrod patří mezi velmi citlivé detekční techniky. Používá se zde série 4 – 16 průtočných coulometrických cel, kde dochází k elektrochemické přeměně analytu [70].

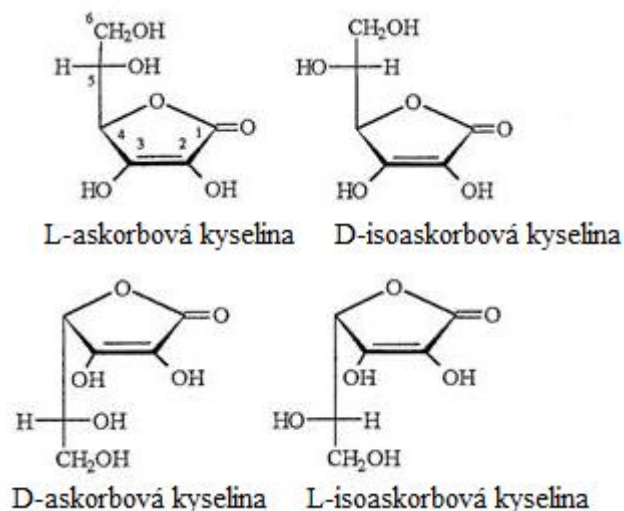
Pro detekci fenolických látek byla vyvinuta nová metoda. Tato metoda je založena na vzájemném působení fenolických látek s diazoniovou solí (Fast Blue BB) v alkalickém prostředí. Po 60 minutách se měří absorbance při 420 nm vzniklých komplexů [68].

2.5 Vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová)

Tento vitamin patří k nejznámějším a k nejrozšířenějším vitaminům. Představuje 80 % veškeré potřeby vitaminů. Již v roce 1742 skotský lékař dr. James Lind testoval účinek citronové šťávy na britských námořnících a objevil tak lék proti kurdějím (vyčerpávající onemocnění, které trápilo většinou námořníky na dlouhých cestách). Ale až v roce 1928 byla v citronové šťávě identifikována vlastní aktivní složka – vitamin C. Jeho chemický název je odvozen od jeho schopnosti předcházet kurdějím neboli skorbutu proto kyselina askorbová [45,71].

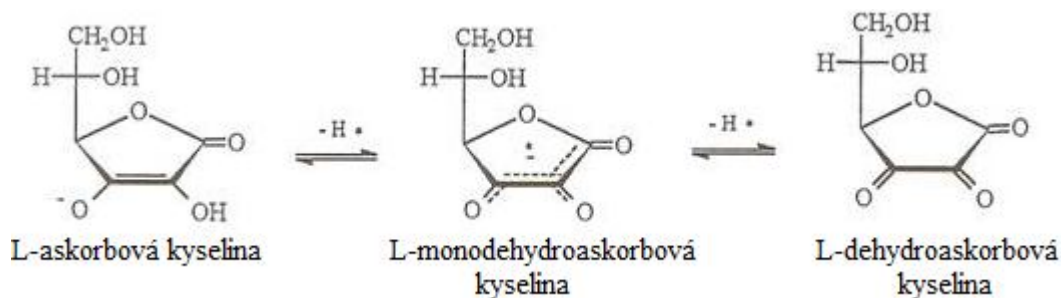
2.5.1 Struktura vitaminu C

Základní biologicky aktivní sloučeninou je kyselina askorbová chemicky zpravidla označována jako γ -lakton kyseliny 2-keto-L-(-) gulonové. Vyskytuje se ve čtyřech stereoisomerních formách, což vidíme na *Obrázku č. 14*. Aktivitu vitaminu C vykazuje pouze kyselina L-askorbová, její isomer D-askorbová kyselina a druhý pár enantiomerů (tj. L a D-isoaskorbová kyselina) nevykazují aktivitu vitaminu [40,72].



Obrázek č. 14: Struktura kyseliny askorbové [73]

Pod názvem vitamin C si musíme představit nejen kyselinu L-askorbovou, ale také reversibilní redoxní systém (viz Obrázek č. 15), který zahrnuje i L-monodehydroaskorbovou kyselinu a L-dehydroaskorbovou kyselinu [72].



Obrázek č. 15: Biologicky aktivní formy vitaminu C [73]

2.5.2 Význam

Vitamin C je ve vodě rozpustný a patří mezi velmi významné antioxidanty (chrání organismus před volnými radikály). Má schopnost zvyšovat obranyschopnost proti chorobám, infekčním nemocem a nachlazení, také pomáhá předcházet alergiím. Je významný pro redukci účinků toxických kovů. V boji proti chorobám jsou důležité bílé krvinky, které jsou aktivovány vitaminem C.

Podílí se na odbourávání cholesterolu v játrech a urychluje tak jeho přeměnu na žlučové kyseliny. Má podpůrnou funkci pro metabolismus vápníku a vstřebávání železa, účastní se oxidoredukčních dějů a podporuje činnost imunitního systému.

Mezi důležité funkce patří syntéza kolagenu za přítomnosti katalyzátoru, kterým je vápník. V případě nedostatku vitaminu C dochází ke zhoršení kvality kolagenu, tím se do těla mohou snadno dostat viry a šířit se tam [40,45,46].

2.5.3 Stabilita

Vitamin C patří mezi labilní látky, je citlivý na působení vzdušného kyslíku, oxidace probíhá intenzivněji v přítomnosti kovů. Je rovněž citlivý na zmrazování, dlouhodobé zahřívání, sušení, ke ztrátám dochází i vyluhováním do vody. Vitamin C je třeba chránit před světlem a měl by se uchovávat v plastových obalech, jelikož ionty kovů katalyzují oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou.

Největší ztráty kyseliny askorbové v ovoci a zelenině vznikají výluhem obvykle při mytí, vaření a konzervování. Ztráty výluhem jsou vyšší u listové zeleniny s velkým povrchem než u kořenové zeleniny. Stabilita kyseliny askorbové je při zpracování vyšší u ovoce s nižším pH než u zeleniny. Největší ztráty jsou způsobeny špatným skladováním, závisí na době a teplotě skladování. Nejstabilnější je vitamin C při zmrazování, při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ dochází k minimálním ztrátám [40,46,72].

2.5.4 Přírodní zdroje

Vitamin C je životně důležitý pro lidský organismus, který si ho ovšem nedokáže sám syntetizovat, a proto ho musíme přijímat z potravy. Nejvíce vitaminu C obsahují plody šípků ($2\,000\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$), patří tak mezi nejbohatší přírodní zdroje. Mezi další dobré zdroje patří petrželová nať, která je bohatá i na další vitaminy a minerální látky. Mezi hlavní zdroje patří ovoce (černý rybíz, citrusy, kiwi, jahody) a zelenina (červená paprika, brambory, brokolice, růžičková kapusta, mrkev atd.). V *Tabulce č. 8* můžeme vidět obsah vitaminu C ve vybraných druzích potravin. Obsah vitaminu v různých druzích ovoce a zeleniny je závislý na vegetačních podmínkách během růstu, stupni zralosti a způsobu posklizňového zpracování [45,72,74].

Tabulka č. 8: Obsah vitaminu C v různých potravinách [37]

Ovoce	Obsah ve 100 g čerstvého ovoce
Angrešt	33 [mg]
Borůvky	16 [mg]
Citron	52 [mg]
Grapefruit	40 [mg]
Kiwi	71 [mg]
Maliny	24 [mg]
Mandarinka	30 [mg]
Ostružiny	21 [mg]
Pomeranč	52 [mg]
Rybíz černý	110 [mg]

2.5.5 Biochemie

Vitamin C se účastní významných hydroxylačních reakcí, které probíhají v organismu. Podílí se na biosyntéze mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpci iontových forem železa, jeho transportu, stimulaci transportu sodných, chloridových a vápenatých iontů. Mezi důležité reakce související s antioxidačními vlastnostmi vitaminu C patří reakce s aktivními formami kyslíku (resp. s volnými radikály) [72].

2.5.6 Fyziologie a výživa

Dříve byl doporučený denní příjem 30 mg vitaminu, u adolescentů to bylo 50 mg a u těhotných žen 60 mg. Dnes je však doporučená denní dávka v Evropské unii 60 mg podle vyhlášky číslo 450/2004 Sb. U nemocných lidí a při rekovalenscenci se doporučuje dávka větší než 1 000 mg.

Nedostatek vitaminu C neboli hypovitaminosa může způsobovat vážné zdravotní problémy jako je zpomalení růstu, kurděje, krvácivost, křehkost kostí atd. [72,74].

2.5.7 Použití vitaminu C

Kyselina askorbová má široké uplatnění, používá se především v konzervářské a kvasné technologii a v technologii masa. V masných výrobcích se pro inhibici tvorby nitrosaminů používá natrium-askorbát a lipofilní 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina. Při výrobě šunky byly jako inhibitory tvorby nitrosaminů použity nepolární acetaly askorbové kyseliny odvozené od mastných aldehydů.

Přidává se k ovocným džusům a konzervovanému ovoci, kde působí preventivně proti nežádoucím změnám např. změna aroma. Při loupání, krájení a sušení slouží k inhibici reakcí enzymového hnědnutí. Kyselina askorbová se také přidává k pivu, kde působí preventivně proti tvorbě chladových a oxidačních zákalů.

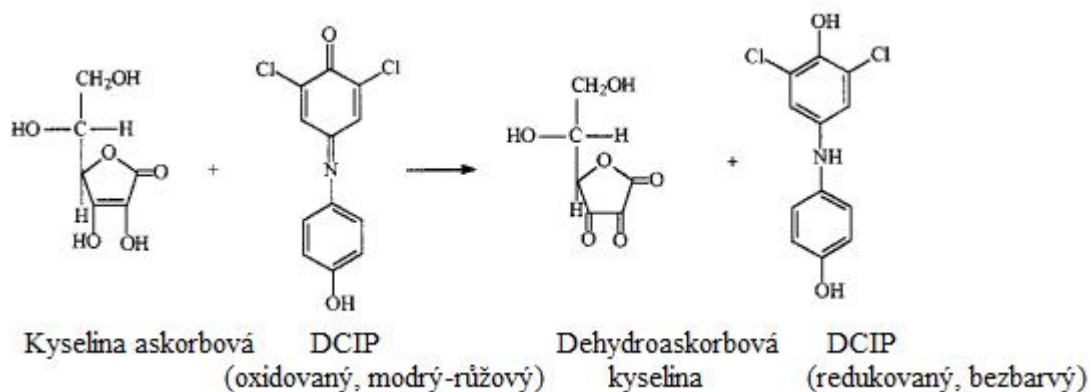
Přídavkem k masu a masným výrobkům zkvalitňujeme a podstatně zrychlujeme výrobu. Přídavek také zkracuje dobu uzení a stabilizuje barvu hotových výrobků [72].

2.5.8 Metody stanovení vitaminu C

Metody stanovení kyseliny askorbové se neustále vyvíjí. Vzorky by měly být co nejdříve zpracovány, aby se zamezilo vlivu vzdušného kyslíku. Mezi metody stanovení patří fluorometrie, HPLC, polarografie a enzymatické metody. Vzhledem k jejím omezením se tyto techniky běžně nepoužívají pro každodenní analýzy. Fotometrické metody jsou obzvlášť atraktivní hlavně díky jejich rychlosti a jednoduchosti [75].

2.5.8.1 Titrační metody

Pro přímou titraci kyseliny askorbové se používá jako činidlo 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP). Askorbová kyselina se v kyselém prostředí oxiduje činidlem DCIP na kyselinu dehydroaskorbovou. Modře zbarvený DCIP se pak redukuje na bezbarvou bázi (viz *Obrázek č. 16*), ale způsobuje růžové zbarvení kyselého roztoku. Tato metoda je použitelná pouze za předpokladu, že koncentrace kyseliny dehydroaskorbové je zanedbatelná. Použitelnost této metody je omezena na vzorky, které neobsahují minerály [75,76].



Obrázek č 16: Redukce DCIP vlivem kyseliny askorbové [75]

Dimethoxydichinon dává spolu s kyselinou askorbovou ve fosfátovém pufru (pH = 6,6) fialově zbarvený produkt. Zbarvený roztok je stabilní, pouze v tmavých podmínkách, přes 24 hodin, jeho absorbance se měří při 510 nm [75].

2.5.8.2 Elektrochemické metody

Sem patří polarografické metody, kde analýza zahrnuje elektrochemickou oxidaci kyseliny L-askorbové na rtuťové kapkové elektrodě. Tato metoda se používá pro stanovení vitamínu C v koření, potravinách, ovoci, zelenině a v kojenecké výživě.

Další elektrochemickou metodou je voltametrické stanovení vitamínu C. Nejčastěji se k tomu využívá uhlíková elektroda. Spolehlivost elektrody klesá s každým použitím, protože dochází k znečištění elektrody oxidačními produkty.

Léčiva mohou být analyzována biamprometrickou titrací s chloridem jodným, peroxomonosulfátem draselným, mědí (II) nebo jodidem draselným, za použití platinové elektrody.

Potenciometrické titrace se používají ke stanovení kyseliny askorbové pomocí DCIP, síranu měďnatého, jodu, hexakynoželeznanu draselného nebo *N*-bromsukcinimidem.

Coulometrické stanovení vitamínu C je založeno na kvantitativní oxidaci kyseliny askorbové na platinové elektrodě. Pro analýzu ovoce, zeleniny a farmaceutických výrobků byla použita metoda oxidace kyseliny askorbové jodem. Uplatňuje se i coulometrické titrace bromem [76].

2.5.8.3 Fluorometrické metody

Fluorometrická analýza se používá pro stanovení kyseliny askorbové v ovoci, zelenině a v lidském séru. Fluorimetrické stanovení je závislé na přítomnosti ketoskupiny v dehydroaskorbové kyselině, ta je kondenzována *o*-fenylendiaminem [76].

2.5.8.4 *Spektrofotometrické metody*

Pro stanovení celkového obsahu vitamínu C ve vzorcích potravin se používá reakce oranžového 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) s keto skupinami kyseliny dehydroaskorbové. Kyselina askorbová se působením bromu oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a ta pak reakcí s DNPH produkuje osazon ($\lambda_{\max} = 545 \text{ nm}$), který se rozpustí přidáním 85% H_2SO_4 [75,77].

2.5.8.5 *Enzymatické metody*

Metoda je založena na reakci kyseliny L-askorbové, která redukuje tetrazoniové soli MMT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-difenyltetrazolium bromid] za přítomnosti elektronového nosiče PMS (5-methylphenazinium methosulphate) při $\text{pH} = 3,5$. Touto reakcí vzniká MMT-formazan, jehož absorbanci měříme spektrofotometricky při 578 nm [40].

Enzymatické kolorimetrické stanovení kyseliny askorbové v ovoci a zelenině se provádí měřením absorbance (při 358 nm) výsledných produktů získaných oxidací *o*-fenyldiaminu nebo 1,4-diaminobenzenu pomocí askorbát oxidázy nebo peroxidázy za přítomnosti peroxidu vodíku [75].

2.5.8.6 *Chromatografické metody*

Pro stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové byla publikována řada separačních metod, nejčastěji se používá kapalinová chromatografie (LC, HPLC). Mezi základní postupy pro stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové patří chromatografie s reverzní fází, iontově výměnná chromatografie a iontově párová chromatografie.

V HPLC se jako stacionární fáze při stanovení vitamínu C používá slabý anex NH_2 , mobilní fáze obsahuje obvykle směs acetonitrilu s fosfátem a přísadu merkaptoethanolu k potlačení oxidace kyseliny askorbové. Nejčastěji využívanou reverzní fází je C_{18} , používá se ve dvou módech (reverzním a v systému iontově párové chromatografie). V reverzním módu se používají mobilní fáze s nízkou hodnotou pH k potlačení ionizace. V iontově párové chromatografii se používají mobilní fáze s přídavkem kvartérní amoniové soli a terciárního aminu. Nevýhodou u reverzní chromatografie je vymývání oxidu křemičitého ze stacionární fáze (silikagelu) při použití nízkého pH .

K detekci se nejčastěji používají univerzální optické detektory (UV, DAD) nebo elektrochemická detekce, která je velmi citlivá. Kyselina askorbová má absorpční maximum v rozsahu 244 až 265 nm, v závislosti na složení mobilní fáze a přítomnosti pufru. Kyselina dehydroaskorbová absorbuje UV záření při 185 nm. V menší míře se využívá i fluorescenční detekce. Ta umožňuje stanovení kyseliny askorbové po její oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou a následné derivatizaci. Derivatizace DHA se používá ke zvýšení citlivosti detekce a k odstranění rušení ze složitých matic [40,78].

2.6 Celková antioxidační aktivita

2.6.1 Antioxidanty

Antioxidanty působí v těle proti volným radikálům, které vznikají v našem organismu při látkové výměně. Tyto volné radikály mají v organismu řadu fyziologických funkcí (např. účastní se protizánětlivých reakcí), avšak při jejich nadměrném množství působí negativně na organismus. Tyto látky narušují buněčné membrány, působí na lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, tak že mění jejich strukturu. Volné radikály mohou způsobovat závažné patologické onemocnění, včetně aterosklerózy a neurodegenerativních onemocnění.

Lidský organismus se přirozeně brání volným radikálům produkováním endogenních antioxidantů. Mezi endogenní nízkomolekulární antioxidanty patří glutathion, kyselina močová a koenzym Q. Pro tělesné potřeby to však nestačí, a proto je musíme přijímat v potravě. K hlavním zdrojům antioxidantů patří samozřejmě ovoce a zelenina. Nejdůležitějšími přírodními antioxidanty jsou vitaminy A, C a E, selen, terpenoidy, měď, mangan a zinek. V posledních letech mají však větší význam polyfenolové sloučeniny, kde patří např. flavonoidy, katechiny a fenolové kyseliny.

Bobulovité ovoce má nejvyšší antioxidační aktivitu mezi běžnými druhy potravin. Bobuloviny obsahují širokou škálu přírodních antioxidantů, jako jsou anthokyaniny, prokyanidiny, flavonoly (kvercetin), flavanoly (katechiny), vitaminy a fytoalexiny.

Při zkoumání antioxidační aktivity není pozornost příliš věnována angreštu, ale jiným druhům ovoce. Hlavními antioxidačními složkami v angreštu jsou kyselina *p*-kumarová, isorhammetin glykosid, kaempferol a quercetin [41,79,80,81].

2.6.2 Metody stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity bylo vyvinuto mnoho metod na základě odlišného chemického a biologického mechanismu antioxidantů. Mezi hlavní metody patří: TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), ORAC (oxygen radical absorption capacity), FRAP (ferric reducing antioxidant power), DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil), a CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) [82,83].

2.6.2.1 Metoda TEAC

Patří mezi základní a nejpoužívanější metody. Metoda používá radikál ABTS [2,2-azinobis (3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazoline-6-sulfonová kyselina)] a zkoumá se schopnost vzorku zhaset tento radikál. Výsledná antiradikálová aktivita se srovná s aktivitou Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Schopnost antioxidantů zhaset radikál ABTS se sleduje spektrofotometricky v závislosti na změně absorpčního spektra ABTS (absorbance se měří při 734 nm). Tato metoda je jednoduchá, rychlá a má široké uplatnění [80].

2.6.2.2 *Metoda ORAC*

Tato metoda se používá v systémech, kde dochází k vzniku kyslíkových radikálů a hodnotí se schopnost látky zpomalit nebo zastavit tuto reakci. Peroxylové radikály jsou indukovány prostřednictvím AAPH [2,2-azobis-(2-amidino-propan) dihydrochlorid] při 37 °C. Jako fluorescenční sonda byl použit fluorescein. Detekce je založena na sledování ztráty fluorescence fluoresceinu po napadení peroxylovými radikály [55].

2.6.2.3 *Metoda FRAP*

Tato metoda je založena na redoxní reakci, kdy dochází k redukci komplexu Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) na železnaté komplexy působením antioxidantů. Absorbance se obvykle měří při 593 nm. Nárůst absorbance odpovídá množství uvedeného komplexu, což odpovídá antioxidační aktivitě vzorku. Měření probíhá při nízké hodnotě pH [80].

2.6.2.4 *Metoda DPPH*

Tato metoda je velmi jednoduchá, pro stanovení antioxidační aktivity využívá stabilní radikál DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Při reakci s antioxidanty se radikál DPPH redukuje na DPPH-H (difenylpikrylhydrazin), což má za následek pokles absorbance při 517 nm. Tento pokles se měří po uplynutí určitého konstantního času, nebo se hodnoty absorbance odečítají v určitých časových intervalech (např. po 10 sekundách). DPPH má fialové zbarvení, které se postupně mění až na žlutou barvu [80,84].

2.7 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová kolonová chromatografie je první objevenou chromatografickou metodou. Byla objevena již v roce 1903 ruským badatelem M. S. Cvětem, který jako první rozdělil listová barviva. K rozvoji této techniky ve vysokoúčinnou formu došlo až koncem šedesátých let. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC neboli High Performance Liquid Chromatography) v současné době patří k významným separačním technikám, s její pomocí můžeme analyzovat velké množství organických látek.

Chromatografie patří do skupiny analytických separačních metod. Při nich dochází k rozdělení látek mezi dvě nemísitelné fáze: pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fází je kapalina a stacionární fází může být tuhá látka nebo kapalina ukotvena na tuhém nosiči. Při pohybu mobilní fáze kolonou dochází k unášení analytu, jehož složky mohou být zachycovány na stacionární fází. Jednotlivé složky se méně či více zachycují na stacionární fází a tím dochází k jejich separaci. Separace jednotlivých složek závisí na interakci se stacionární fází a také na použité mobilní fází.

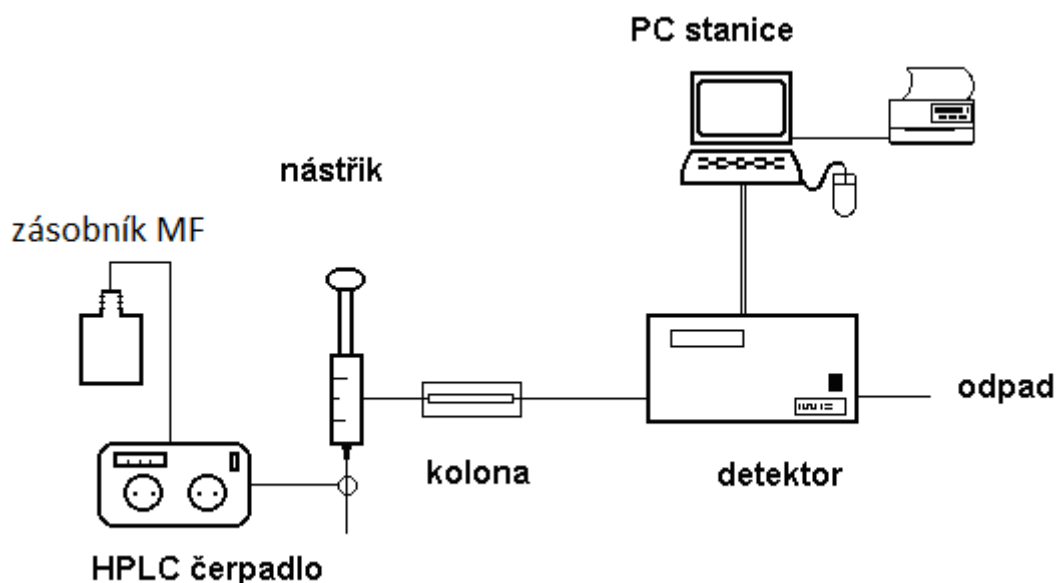
Jednotlivé separované složky analytu jsou poté detekovány a signál je převeden na chromatografický záznam, který se nazývá chromatogram (závislost intenzity sledované veličiny na čase). Na chromatogramu pozorujeme eluční křivky gausovského tvaru – píky [74,85,86].

2.7.1 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí, které mají následující funkce:

- Uchovávání a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo).
- Dávkování vzorku (autosampler, manuální dávkovací ventil).
- Separace látek (chromatografická kolona).
- Detekce látek (detektor).
- Záznam dat pro následné vyhodnocení (počítač a software).

Na *Obrázku č. 17* je znázorněno schéma kapalinového chromatografu, který může obsahovat i některé komponenty navíc (např. směšovač při gradientové eluci, degasser atd.).



Obrázek č. 17: Schéma kapalinového chromatografu [87]

2.7.1.1 Transport a uchovávání mobilní fáze

Zásobník mobilní fáze obsahuje speciální filtry kovové nebo teflonové (porozita 0,20 μm), které slouží k zachycení tuhých částic. Zásobník mobilní fáze musí být dobře uzavřen, aby nedocházelo ke kontaminaci z okolního prostředí (prach, mikroorganismy). Spoje mezi jednotlivými součástmi jsou zhotoveny z teflonu nebo z nerez oceli.

Součástí některých chromatografů je odplynovač, který slouží k odplynění mobilní fáze. Odplyněním mobilní fáze eliminujeme některé problémy např. nestabilitu základní linie a tím i snížení citlivosti detekce, špatnou opakovatelnost retenčních časů apod. Plyny v mobilní fázi mají vliv na funkci vysokotlakého čerpadla, tok mobilní fáze není pak bezpulsní a opakovatelný. V současnosti se nejvíce používá k odplynění vakuový degasser. Zavzdušnění mobilní fáze můžeme ovlivnit volbou zásobníku a jeho umístěním. Zásobník by měl být umístěn výše než chromatografické čerpadlo a měl by mít vhodný uzávěr umožňující vyrovnání tlaků.

Čerpadlo zajišťuje stálý průtok mobilní fáze, který se udává v $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Nejmodernější kapalinové chromatografy pracují s tlakem v rozmezí 1 – 60 MPa, což umožňuje dosahovat velkých průtoků mobilní fáze.

Na vysokotlaká čerpadla jsou kladeny náročné požadavky:

- Materiál, ze kterého jsou čerpadla zhotoveny, musí být odolný vůči korozi i v případě použití agresivních mobilních fází (nerezová ocel, titan, keramika).
- Průtok mobilní fáze musí být bezpulsní, bez monotónních změn a měl by být přesný.
- Vnitřní objem čerpadel by měl být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze.
- Mělo by jít měnit průtok v širokém rozmezí hodnot od 0,1 do 10,0 ml [74,86,88].

Vysokotlaká čerpadla mobilní fáze

Vysokotlaká čerpadla lze rozdělit do dvou skupin podle toho, zda pracují za konstantního tlaku nebo za konstantního objemového průtoku. Mezi čerpadla pracující za konstantního tlaku patří pneumtická čerpadla, kde je zdrojem hnací síly stlačený plyn a čerpadla s mechanickým pohonem, u nichž se používají elektromotory.

- Pneumatická čerpadla – pracují za konstantního tlaku, průtok mobilní fáze lze regulovat změnou tlaku plynu. V současnosti se nepoužívají vzhledem k jejich maximálnímu tlaku na vstupu, který je okolo 3,0 až 5,0 MPa.
- Pístová čerpadla – pro čerpadla je typická pulzní charakteristika tlaku a průtoku. Jednou z výhod čerpadla je neomezené dávkování mobilní fáze bez přerušení toku.
- Membránová čerpadla – tato čerpadla nejsou v současnosti téměř vůbec používána vzhledem k jejich konstrukční náročnosti a údržbě [86,88].

2.7.1.2 Dávkování vzorku

Dávkování vzorku hraje v účinnost chromatografického procesu důležitou roli. Špatné dávkování vzorku způsobuje rozmývání píku vlivem mimokolonového příspěvku, především při použití mikrokolon a krátkých kolon. Vzorky lze dávkovat třemi odlišnými způsoby:

1. Vzorek lze dávkovat přímo na sorbent v koloně injekční stříkačkou přes vhodné septum nebo bez použití septa. V současnosti se nepoužívají z důvodu vysokých tlakových nároků na septum.
2. Dávkování vzorku pomocí vysokotlakého dávkovacího ventilu se smyčkou a bez přerušení toku mobilní fáze.
3. Použití automatického dávkovače (tzv. autosampleru) [86,89].

2.7.1.3 Separace látek (chromatografické kolony)

Před samotnou kolonou lze použít ještě předkolonu (guard column), která chrání chromatografickou kolonu před možnou mechanickou kontaminací (nečistoty v mobilní fázi, nečistoty ze systému) nebo chemickou. Její použití však způsobuje zvýšení mrtvého objemu a může tak snižovat účinnost separace.

Rozhodující význam pro chromatografickou analýzu má výběr vhodné kolony. Účinnost separace látek závisí na kvalitě kolony a její náplni, na velikosti částic sorbentu, na délce kolony a na její šířce. Kolony mohou mít různé parametry, délka se nejčastěji pohybuje mezi 10 – 500 mm a šířka okolo 3,0 – 25 mm. Důležitá je také velikost částic, která ovlivňuje separační vlastnosti. Kolony jsou vyrobeny především z nerezové oceli, která je vysoce antikorozivní a odolává vysokým tlakům. Avšak při použití mobilních fází obsahujících

chloridy dochází ke snížení odolnosti. Dokonce i při použití dichlormetanu či acetonitrilu dochází k vyluhování železa z nerezové oceli.

Materiál, z kterého je zhotovena kolona musí mít určité vlastnosti:

- Musí být odolný vůči vysokým tlakům, až do 100 MPa.
- Musí odolávat chemickému působení mobilní fáze.
- Vnitřní povrch by měl být dokonale hladký.

Mezi další materiály, z kterých může být vyrobena kolona, patří speciálně tvrzené borosilikátové sklo nebo PEEK (polymer: polyetheretherketon) [74,88].

2.7.1.4 Detekce látek (detektor)

Detektory bývají umístěny za chromatografickou kolonou. Dělíme je do dvou skupin na koncentrační a hmotnostní. V současnosti se používají především koncentrační detektory, které poskytují signál úměrný koncentraci látek v eluátu. Koncentrační detektory můžeme rozdělit do dvou skupin na selektivní (signál je úměrný koncentraci analyzované látky v eluátu) a univerzální detektory (signál je úměrný dané vlastnosti eluátu, jako celku).

Požadavky na detektor: [86,89]

- Vysoká citlivost
- Nízká úroveň šumu
- Univerzálnost
- Signál nezávislý na změně tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- Minimální příspěvek k rozmývání elučních zón
- Nedestruktivnost
- Linearita
- Spolehlivost a snadnost použití
- Specifická

Spektrofotometrické detektory (ultrafialová – viditelná oblast)

Spektrofotometrické detektory jsou ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii nejužívanější, jejich principem je absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm.

Detekované látky absorbují záření vlnové délky použité k detekci. Detektory rozdělujeme do 4 skupin podle vlnové délky, která se používá k měření:

1. Detektory pracují s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou, zdrojem záření je rtuťová výbojka, která je opatřena interferenčním filtrem. U nižších vlnových délek se jako zdroj záření používá nízkotlaká zinková výbojka nebo nízkotlaká kadmiová výbojka.
2. Detektory pracují s několika předem zvolenými vlnovými délkami. Jednotlivé vlnové délky vybíráme výměnou interferenčního filtru.
3. Spektrofotometrické detektory s monochromátorem, u nichž můžeme nastavovat vlnovou délku. Nastavením monochromátoru lze měnit libovolné vlnové délky, což je velkou výhodou. Nevýhodou je nižší citlivost, než u detektorů s pevně nastavenou vlnovou délkou.
4. Spektrofotometrické detektory, které rychle zaznamenávají spektra bez přerušení chromatografické separace. Pracují s velkým počtem plošných fotodiód, které jsou umístěny na destičce o délce 1 cm.

Spektrofotometrický detektor je založený na kontinuálním měření absorbance mobilní fáze, vlnovou délku lze libovolně měnit pomocí monochromátoru. Detekce je založena na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vztah: $A = \varepsilon \cdot c \cdot L$, kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace a L je délka absorpčního prostředí. Hodnota molárního absorpčního koeficientu souvisí s citlivostí detekce, čím je hodnota vyšší, tím je lepší i citlivost detektoru [89,90].

2.7.2 Stacionární fáze

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou chromatografického systému. Jedná se o tuhou látku nebo film kapaliny, který je zakotvený nebo chemicky navázaný na tuhou matici neboli nosič. Jedná se o náplň kolony, na které dochází k separaci látek. Stacionární fáze se z historického hlediska dělí podle jejich skupenství na kapalnou a tuhou, mluví se pak o kapalinové rozdělovací chromatografii (LLC) nebo o kapalinové adsorpční chromatografii (LSC).

Dalším členěním je rozdělení na fáze polární, nepolární a amfoterní (ambojité), ale ani toto členění nestačí. V současnosti se fáze dělí podle chromatografického módu separace na:

- Normální
- Reverzní
- Ionexy
- HILIC
- HIC
- Gely

Stacionární fáze musí splňovat určité požadavky, musí být chemicky a tepelně stabilní, nesmí reagovat s mobilní fází a nesmí se v ní rozpouštět. Vymývání stacionární fáze z kolony se projevuje snížením citlivosti detekce nebo jejím znemožněním. Vymývání stacionární fáze způsobuje použití nevhodné mobilní fáze nebo vysoké teploty.

2.7.2.1 Systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC)

V systémech s reverzními fázemi je mobilní fáze polární, obvykle je to směs vodné složky (voda, zředěné vodné roztoky kyselin a zásad, pufrů) s polárními organickými rozpouštědly (alkoholy, acetonitril nebo tetrahydrofuran). Stacionární fáze jsou nepolární, nejčastěji se jedná o dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch nosiče (silikagel). Nejčastěji používanou stacionární fází je silikagel s chemicky vázanými alkyly např. C18 (ODS = oktadecylsilikagel) [86].

2.8 Molekulová absorpční spektrometrie v oblasti UV-VIS

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které jsou schopny absorbovat elektromagnetické záření v rozmezí vlnových délek asi 200 až 800 nm. Mezi 180 – 380 nm se nachází blízká UV oblast a při 380 – 780 nm se jedná o běžnou viditelnou část spektra. Absorbovaná energie vyvolává přechody valenčních elektronů, změny vibračních a rotačních stavů molekul nebo změny energetických stavů magnetických momentů elektronů nebo jader.

Látky absorbující záření s vlnovou délkou menší než 380 nm, se jeví jako bezbarvé. Látky absorbující z bílého slunečního světla záření vlnové délky v rozsahu 380 – 770 nm se projevují jako barevné. Oblast záření, která má vlnovou délku menší než 200 nm se označuje jako vakuová ultrafialová oblast [88,91].

2.8.1 Přístrojové vybavení

Pro měření absorpčních spekter molekul a ke stanovení jejich koncentrace ve vzorku používáme spektrometry nebo spektrofotometry. Spektrometrem snímáme absorpční křivku tj. závislost transmitance nebo absorbance na vlnové délce. Přístroj se skládá z pěti základních částí:

1. Zdroj záření se spojitým spektrem.
2. Disperzní systém, kterým je mřížkový nebo hranolový monochromátor, který rozkládá polychromatické záření na monochromatické složky. Skládá se ze vstupní štěrbin, disperzního prvku, optické soustavy a výstupní štěrbin, kde se zobrazí svazek záření s úzkým intervalem vlnových délek.
3. Absorpční prostředí (roztok vzorku v kyvetě).
4. Pomocná optika (na vedení paprsků přístrojem).
5. Detektor [91,92].

Zdroj záření

Jako zdroj spojitého záření se pro UV oblast používají nejčastěji vodíková nebo deuteriová výbojka, která má mnohem větší intenzitu. Vodíková výbojka je plněná vodíkem, vodíkové molekuly se elektrickým výbojem excitují a při zpětné deexcitaci emitují UV záření. Pro viditelnou oblast se používají wolframové nebo halogenové výbojky [91].

Monochromátory

Monochromátory lze získat monochromatické záření, používají se k tomu lámavé hranoly nebo mřížky ve spojení se vstupní a výstupní štěrbinou. Spojité spektrum je rozloženo lomem nebo ohybem a výstupní štěrbinou vymezujeme úzké pásy monochromatického záření. Spektrální šířka štěrbin u kvalitních spektrometrů je okolo 0,01 nm u jednoduchých přístrojů je to asi 10 nm [88,92].

Absorpční prostředí

Absorpční prostředí tvoří kyveta s roztokem, která se vkládá mezi monochromátor a detektor záření. Nejčastěji se používají 1 cm kyvety. Tloušťku kyvety volíme v závislosti na koncentraci a hodnotu absorpčního koeficientu tak, aby hodnota absorbance byla 0,1 – 1,0. Pro ultrafialovou oblast se používají křemenné kyvety a pro viditelnou oblast skleněné, popř. plastové kyvety [88,91].

Detektory

Pro měření velikosti absorpce se používají fotoelektrické detektory citlivé na ultrafialové a viditelné záření, často s výstupem na registrační zařízení [88].

2.8.2 Využití spektrofotometrie

Pro stanovení vzorku se měří absorpční spektrum, což je závislost absorbance na vlnové délce. Také se měří závislost absorbance na čase. Vyhodnocení provádíme metodou kalibrační závislosti nebo metodou standardního přídatku.

Spektrofotometrii využíváme ke stanovení iontů kovů po převedení na barevné komplexy s organickými činidly. Také můžeme stanovovat anorganické anionty, organické látky a sloučeniny zejména v UV oblasti [91].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vzorky

K analýze byly použity zelenoplodé (Rixanta, Mucurines, Prima, Zebín), žlutoplodé (Citronový obří, Darek, Invicta, Zlatý fík) a červenoplodé (Alan, Karát, Karmen, Krásno, Hinnonmaki Rot, Remarka, Rodnik, Rolonda, Tamara) odrůdy angreštu. Vzorky pocházely z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích s.r.o. (dále jen Holovousy) a od soukromého pěstitele Vondráčka. Na obou stanovištích (Holovousy a Vondráček) byly keře angreštu pěstovány ve dvou pěstitelských tvarech: Keř a V (tvar V – v keři jsou ponechány jen dvě základní větve). K analýzám byly tedy dodány od každé sledované odrůdy 4 vzorky plodů (pokud keř dorostl do stádia plodnosti. Přehled analyzovaných vzorků angreštu popisuje *Tabulka č. 9*.

Všechny odrůdy z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích (Holovousy) byly sesbírány na konci měsíce července roku 2013 a odrůdy od pěstitele Vondráčka byly sesbírány v první polovině července roku 2013. Plody angreštu byly po sklizni uchovávány v sáčcích v mrazícím zařízení na FCH VUT v Brně při teplotě – 18 °C a byly zde uchovávány až do doby analýzy.

Tabulka č. 9: Analyzované vzorky angreštu

Odrůda	Holovousy	Vondráček
Alan	Keř i V	V
Citronový obří	Nebyl k dispozici ani jeden typ	Keř i V
Darek	Nebyl k dispozici ani jeden typ	V
Hinnonmaki Rot	Keř i V	Keř i V
Invicta	Keř i V	Keř i V
Karát	Keř i V	Keř i V
Karmen	V	Keř i V
Krasnoslawjankij	Keř i V	Keř i V
Mucurines	Keř i V	Nebyl k dispozici ani jeden typ
Prima	Nebyl k dispozici ani jeden typ	V
Remarka	Keř i V	Keř i V
Rixanta	Keř i V	Keř i V
Rodnik	Keř i V	Nebyl k dispozici ani jeden typ
Rolonda	Keř i V	Nebyl k dispozici ani jeden typ
Tamara	Nebyl k dispozici ani jeden typ	V
Zebín	Nebyl k dispozici ani jeden typ	V
Zlatý fík	Nebyl k dispozici ani jeden typ	V

3.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo (zkumavky, odměrné baňky, kádinky atd.).
- Stojan na zkumavky.
- Nůž.
- Vialky s uzávěry
- Büchnerova nálevka.
- Filtrační baňka.
- Kyvety z optického skla.
- Centrifugační kyvety.
- Automatická pipeta 200 µl, 1000 µl (Biohit, Finsko).
- Dělené pipety.
- Filtrační papír K0 (Papírny Perštejn, ČR).
- Mikrofiltry 0,45 µm (Membrane Solutions).
- Injekční stříkačky, 2 ml (Chirana Injecta, SR).
- Mikrostříkačka, 25 µl (Hamilton, USA).

3.3 Přístroje

- Chladnička s mrazničkou (Amica, Polsko).
- Chladnička s mrazničkou (Elektrolux, Švédsko).
- Chladnička s mrazničkou (Zanussi, Švédsko).
- Analytické váhy (Boeco, Německo).
- Ultrazvuková lázeň NETZ (Kraintek, SR).
- Ruční homogenizátor Ultra Torax T18 Basic (IKA, Německo).
- Magnetická míchačka (Lavet, ČR).
- Výměna KNF LAB Laboport (Labicom, ČR).
- Přístroj na přípravu demineralizované vody (Labicom, ČR).
- pH metr (Monokrystaly s.r.o., ČR).
- Kombinovaná pH elektroda (Monokrystaly s.r.o., ČR).
- Vortex (TTS Yellow line, USA).
- Centrifuga T 52.1 (MLW, Německo).
- Spektrofotometr Helios Delta (Spectronic Unicam, USA).
- HPLC přístroj (Waters, USA):
 - UV detektor: Waters 2487 Dual Absorbance Detektor.
 - Čerpadlo: Waters 1515 Isocratic HPLC pump.
 - Odplyňovač: Waters In – Line Degasser AF.
 - Kolona: Gemini C18 110 A – Phenomenex.
- Počítač (DELL, USA), software Breeze.

3.4 Chemikálie

- Redestilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR).
- Kyselina metafosforečná, 56 – 60%, CAS 37267-86-0 (VWR Prolabo Chemicals).
- Kyselina L-askorbová, 99,0%, CAS 50-81-7 (Sigma-Aldrich, Německo).
- Dihydrogenfosforečnan draselný, 99,0%, CAS:7778-77-0 (Lachema a.s., ČR).
- Methanol, 99,9%, CAS: 67-56-1 (pro HPLC, Sigma-Aldrich, Německo).
- Methanol, 99,9%, CAS: 67-56-1 (pro HPLC, Scharlau Chemie a.s., Španělsko).
- Kyselina chlorovodíková, 35%, CAS: 7647-01-0 (Lach-ner, ČR).
- Chlorid draselný, 99,0%, CAS: 7447-40-7 (Lachema, ČR).
- Trihydrát octanu sodného, 99,0%, CAS: 6131-90-4 (Lachema, ČR).
- Bezvodý uhličitán sodný, 99,0%, CAS: 497-19-8 (Lachema, ČR).
- Kyselina gallová, 97,5 – 102,5%, CAS: 149-91-7 (Penta, ČR).
- Folin – Ciocalteuovo činidlo, CAS: 521-24-4 (Penta, ČR).
- 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, CAS: 1898-66-4 (Sigma-Aldrich, Německo).
- Kalibrační pufrы pH metru (Hanna Instruments, USA).

3.5 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou

3.5.1 Příprava roztoků

Příprava KCl pufru; 0,025 mol·l⁻¹ roztok chloridu draselného o pH 1

Na analytických váhách bylo naváženo přibližně 0,9300 g NaCl. Navážka byla kvantitativně převedena do kádinky a rozpuštěna v 490 ml destilované vody. Na pH metru bylo změřeno pH a jeho hodnota byla upravena pomocí koncentrované HCl na požadované pH 1,0. Poté byl tento roztok převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Příprava acetátového pufru; 0,4 mol·l⁻¹ roztok octanu sodného o pH 4,5

Na analytických váhách bylo naváženo přibližně 27,2150 g trihydrátu octanu sodného. Navážka byla kvantitativně převedena do kádinky a rozpuštěna v 480 ml destilované vody. Po změření pH byla jeho hodnota upravena na požadované pH 4,5 pomocí koncentrované HCl. Poté byl roztok převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.5.2 Příprava vzorku

Na analytických váhách bylo naváženo 4 – 6 g zmražených plodů jednotlivých odrůd angreštu. K navážce bylo přidáno přibližně 10 ml destilované vody a směs byla pomocí homogenizátoru rozmixována. Poté byla opatrně pasteurovou pipetou omyta hlavice homogenizátoru do kádinky se vzorkem. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky, doplněn destilovanou vodou po rysku a na 1 hodinu byl dán do lednice. Poté byl obsah odměrné baňky centrifugován na laboratorní centrifuze při rychlosti asi 5 000 otáček·min⁻¹ po dobu 1 minuty a vzniklý supernatant byl dále zfiltrován za podtlaku přes Büchnerovu nálevku.

3.5.3 Vlastní stanovení

Do šesti zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml vzorku extraktu. Poté bylo do prvních 3 zkumavek přidáno 2,5 ml KCl pufru o pH 1 a do zbylých 3 zkumavek 2,5 ml acetátového pufru o pH 4,5. Obsah každé zkumavky byl proměřen na spektrofotometru při vlnových délkách 510 a 700 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

3.5.4 Výpočty

Výpočet absorbance zředěného vzorku:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH_1} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4,5}}, \quad (1)$$

kde A je absorbance zředěného vzorku při dané vlnové délce a pH roztoku.

Výpočet koncentrace monomerního anthokyanového pigmentu:

$$c_{MP} = \frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}, \quad (2)$$

kde c_{MP} [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$] je koncentrace monomerního pigmentu, A je absorbance zředěného vzorku, MW je molekulová hmotnost kyanidin 3-glukosidu [$MW = 449,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$], DF je faktor ředění, ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-glukosid [$\varepsilon = 26\,900 \text{ l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$], l je délka optické dráhy [1 cm].

Přepočet koncentrace monomerního pigmentu na 100 g čerstvých plodů:

$$c = \frac{c_{MP} \cdot V \cdot 0,1}{m}, \quad (3)$$

kde c [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] je obsah monomerního anthokyanu ve 100 g plodů, c_{MP} je koncentrace monomerního pigmentu [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$], V je objem šťávy získané z plodů [25 ml] a m je hmotnost navážky plodů [g].

3.6 Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

3.6.1 Příprava roztoků

Příprava 7,5% roztoku uhličitanu sodného

Bylo naváženo 37,5 g bezvodého uhličitanu sodného. Navážka byla poté rozpuštěna v destilované vodě a kvantitativně převedena do 500 ml odměrné baňky. Po doplnění odměrné baňky po rysku byl obsah baňky promíchán a uchováván v lednici.

Příprava kalibračních roztoků

Na analytických váhách bylo naváženo 0,0250 g kyseliny gallové. Rozpuštěním navážky v destilované vodě a převedením do 25 ml odměrné baňky vznikl zásobní roztok kyseliny gallové o koncentraci $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 0,125; 0,5; 1 a 2 ml do 10 ml odměrných baněk a tím byla připravena série kalibračních roztoků o koncentracích 12,5; 25, 50, 100 a $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.6.2 Příprava vzorku

Postup je shodný s přípravou vzorku u stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou viz kapitola 3.5.2.

3.6.3 Vlastní stanovení

Do tří zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml vzorku extraktu, který byl zředěn 2x popř. 3x. Směs byla promíchána a po pěti minutách byl přidán 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného. Směs byla opět promíchána na vortexu a po dvou hodinách byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm proti blanku. Postup přípravy blanku je totožný s postupem přípravy vzorku, pouze vzorek extraktu nahradila destilovaná voda.

Při stanovení kalibrační křivky byl použit stejný postup, jen do zkumavek bylo místo extraktu vzorku přidáváno 0,1 ml kalibračních roztoků. Každý roztok kalibrační křivky byl rovněž pipetován do 3 zkumavek.

3.6.4 Výpočty

Celková koncentrace polyfenolů byla vypočtena z regresní rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové:

$$A = 0,004 \cdot c + 0,015 \quad (4)$$

Koncentrace byla přepočítána na mg v 100 g čerstvých plodů.

3.7 Stanovení vitamínu C metodou HPLC

3.7.1 Příprava roztoků

Příprava mobilní fáze: fosfátový pufr:methanol (9:1)

Navážka 13,0625 g dihydrogenfosforečnanu draselného byla rozpuštěna v 900 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 100 ml methanolu, roztok byl nalit do zásobní láhve a následně odplyněn v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Příprava extrakčního činidla: 2% kyselina monohydrogenfosforečná

Do větší kádinky bylo naváženo 17 g kyseliny metafosforečné. K navážce bylo přidáno 100 ml redestilované vody a vše se zahřívalo na míchadle do rozpuštění. Poté byl roztok opatrně převeden do 500 ml odměrné baňky, doplněn redestilovanou vodou po rysku a uchováván v lednici.

Příprava zásobního standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 1 g·l⁻¹

Bylo naváženo 0,0250 g kyseliny askorbové a rozpuštěno v 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn po značku. Roztok byl uchováván v lednici v tmavé odměrné baňce kvůli jeho nestabilitě.

Příprava standardních roztoků pro kalibrační křivku

Zředěním zásobního roztoku kyseliny askorbové 2% kyselinou monohydrogenfosforečnou byly připraveny standardní roztoky o koncentracích 1, 10 a 40 mg·l⁻¹. Jednotlivé standardní roztoky byly připravovány vždy bezprostředně před nástřikem a během měření byly uchovávány v lednici.

3.7.2 Příprava vzorku

Do třech malých kádinek bylo na analytických váhách odváženo 4 – 6 g zmražených plodů. K navážce bylo přilito extrakční činidlo (přibližně 10 ml) a vzorek byl pomocí homogenizátoru rozmixován. Poté byla hlavice homogenizátoru omyta pasturovou pipetou do kádinky se vzorkem a špachtlí byly odstraněny viditelné kousky vzorku zachycené na hlavici. Obsah kádinky byl převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a extrakčním činidlem upraven po rysku. Obsah odměrné baňky byl dobře promíchán a zfiltrován za podtlaku přes Büchnerovu nálevku. Vzniklý filtrát byl přefiltrován přes mikrofiltr a nastříknut do chromatografu.

3.7.3 HPLC analýza

HPLC analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu HPLC Waters viz *Obrázek č. 18*. Měření proběhlo na koloně Gemini C18 o rozměru 150 x 4,6 mm s průměrem částic 5 μm s předřazenou předkolonou 4 mm Cartige C18. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr s methanolem a jako extrakční činidlo 2% kyselina monohydrogenfosforečná (roztoky byly připraveny dle kapitoly 3.7.1). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml·min⁻¹. Velikost nástřiku byla 20 μl a teplota v průběhu analýzy byla 25 °C. Analyt byl detekován při vlnové délce 254 nm. Vlastní analýza probíhala 4 minuty a následné proplachování kolony trvalo 8 minut.



Obrázek č. 18: Chromatograf

3.7.4 Stanovení celkového množství vitamínu C

Identifikace kyseliny askorbové byla provedena porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech a roztoků kalibrační křivky. Plocha píku jak kyseliny askorbové, tak kalibračních roztoků byla získána integrací v systému Breeze. Byly provedeny tři nástřiky, z nichž byla vypočtena průměrná plocha píku a vynesení do regresní rovnice kalibrační křivky byla stanovena průměrná koncentrace kyseliny askorbové v daném extraktu [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]. Vypočítaná koncentrace byla přepočtena na navážku původního vzorku a vyjádřena v mg na 100 g plodů dle vztahu:

$$c = \frac{x \cdot V \cdot F \cdot 0,1}{m} \quad (5)$$

kde c je koncentrace kyseliny askorbové vyjádřena v mg na 100 g plodů, x je koncentrace kyseliny askorbové odečtená z kalibrační křivky [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$], V je celkový objem vzorku [ml], F je faktor ředění, 0,1 je koeficient pro přepočet na 100 g plodů a m je navážka vzorku [g].

3.8 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

3.8.1 Příprava roztoků

Příprava standardního roztoku volného radikálu DPPH

Bylo naváženo 0,0060 g volného radikálu DPPH. Navážka byla rozpuštěna v methanolu, kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna methanolem po rysku.

3.8.2 Příprava vzorku

Pro analýzu byl vybrán pouze pěstitelský tvar V od pěstitele Vondráčka příp. z Holovous u odrůd Mucurines, Rolonda, Rodnik a Alan. Na analytických váhách bylo naváženo kolem 4 g vzorku. K navážce bylo přidáno přibližně 10 ml methanolu a vzorek byl zhomogenizován. Hlavice homogenizátoru byla očištěna, obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Obsah odměrné baňky byl zfiltrován za podtlaku přes Büchnerovu nálevku. Poté byl roztok 3krát zředěn u zelených a žlutých odrůd, 5krát zředěn u červených odrůd.

3.8.3 Vlastní stanovení

Do kyvety bylo vždy nepipetováno 1,5 ml zředěného vzorku a k tomu bylo přidáno 1,5 ml roztoku volného radikálu DPPH. Ihned po přidání roztoku radikálu byla měřena absorbance pomocí UV/VIS spektrofotometru Helios (viz *Obrázek č. 19*) při vlnové délce 517 nm. Hodnoty absorbance byly zaznamenávány po dobu 6 minut v časovém intervalu 10 s. Jako blank byl použit methanol. Dále byla změřena hodnota absorbance roztoku, který vznikl smícháním 1,5 ml roztoku DPPH s 1,5 ml methanolu.



Obrázek č. 19: Spektrofotometr Helios Delta

3.8.4 Výpočty

Z naměřených dat byla sestrojena závislost poklesu absorpance na čas. Byla vypočtena antioxidační aktivita podle následujícího vztahu:

$$AA = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \cdot 100, \quad (6)$$

kde A_0 je hodnota absorpance roztoku volného radikálu DPPH s methanolem v poměru 1:1, A_i je hodnota absorpance vzorku s roztokem DPPH v určitém čase [93].

3.9 Statistické zpracování výsledků

V každém stanovení byl vzorek změřen celkem třikrát, jako výsledek je uvedena vždy průměrná hodnota z těchto tří měření. V programu Microsoft Excel 2003 byla pomocí funkce SMODCH vypočtena směrodatná odchylka a pomocí funkce CONFIDENCE byla odchylka rozšířena pro interval spolehlivosti (95 %). Tato hodnota intervalu spolehlivosti byla uvedena ve výsledcích spolu s průměrnou hodnotou a v grafech je zobrazena v podobě chybových úseček.

Pro statistické vyhodnocení shodnosti jednotlivých naměřených hodnot byl použit Lordův test pro shodnost.

$$u = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{R_A + R_B}, \quad (7)$$

kde \bar{x}_A a \bar{x}_B jsou aritmetické průměry porovnávaných výsledků, R_A a R_B jsou rozptyly daných výsledků. Rozptyl je pak rozdíl mezi maximální a minimální naměřenou hodnotou.

Výsledky pak byly porovnávány s kritickou hodnotou (1,304) na hladině statistické významnosti 0,05. Pomocí Lordova testu byly porovnány následující výsledky:

- Porovnání shodnosti výsledků mezi pěstitelskými tvary Keř a V od pěstitele Vondráčka
- Porovnání shodnosti výsledků mezi pěstitelskými tvary Keř a V z Holovous
- Porovnání shodnosti výsledků u pěstitelského tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous
- Porovnání shodnosti výsledků u pěstitelského tvaru Keř od pěstitele Vondráčka a z Holovous

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovení jednotlivých chemických parametrů jako je obsah anthokyanů, vitaminu C, fenolických látek a antioxidační aktivita ve vzorcích studovaných odrůd angreštu. Práce byla zaměřena na zpracování literární rešerše zabývající se charakteristikou angreštu a metodami stanovení jednotlivých chemických parametrů. V závěru práce je uvedeno zhodnocení studovaných odrůd angreštu z hlediska obsahu vybraných chemických parametrů a vzájemně porovnány obě stanoviště i oba pěstitelské tvary.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou

Stanovení obsahu anthokyanů v plodech vybraných zelenoplodých, žlutoplodých a červenoplodých odrůd bylo provedeno podle návodu v kapitole 3.5.3. Každá odrůda byla proměřena třikrát a výsledky byly statisticky zpracovány. Celkový obsah monomerního pigmentu byl vypočítán pomocí rovnic (1) a (2) a podle rovnice (3) byl obsah přepočítán na 100 g čerstvých plodů. Ve vztahu pro výpočet byl použit anthokyan kyanidin 3-glukosid, který je nejvíce zastoupený v plodech angreštu.

Výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm interval spolehlivosti (v grafech je zobrazen jako chybová úsečka) a jsou rozděleny do jednotlivých kapitol podle barvy odrůdy.

Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v *Příloze 1*. Statistické zpracování, kde jsou porovnávány celkové obsahy monomerního pigmentu, z hlediska různých pěstitelů (Vondráček a Holovousy) a pěstitelských tvarů (V a Keř) je uvedeno v kapitole 4.1.4.

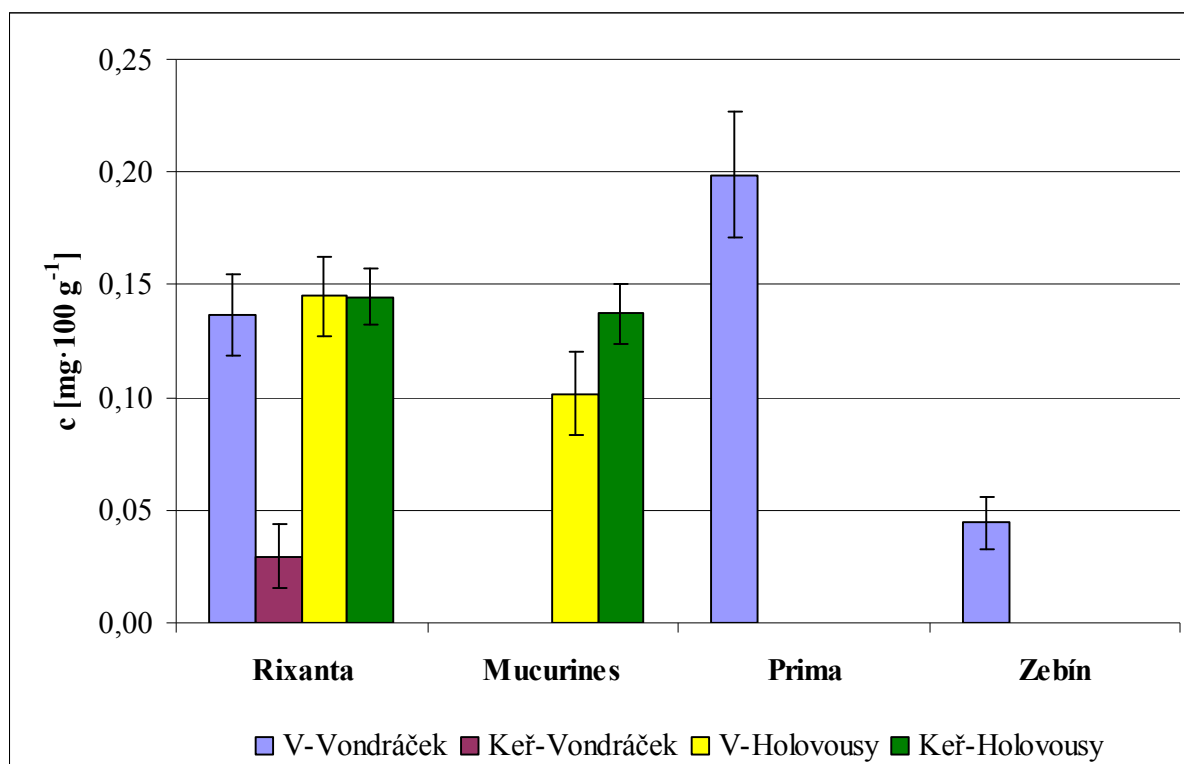
5.1.1 Zelenoplodé odrůdy

Obsah anthokyanů v zelených odrůdách angreštu je velmi malý, vzhledem k tomu, že anthokyany dávají rostlinám především modré a červené zbarvení. Na obsah anthokyanů byla analyzována kompletní sada vzorků (tzn. V a Keř od Vondráčka i z Holovous) pouze u odrůdy Rixanta.

Tabulka č. 10: Vypočítané hodnoty celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu v plodech zelenoplodého angreštu

Zelenoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu c [mg·100 g ⁻¹]
Rixanta V – Vondráček	0,14 ± 0,01
Rixanta Keř – Vondráček	0,03 ± 0,01
Rixanta V – Holovousy	0,14 ± 0,02
Rixanta Keř – Holovousy	0,14 ± 0,01
Mucurines V – Holovousy	0,10 ± 0,02
Mucurines K – Holovousy	0,14 ± 0,01
Prima V – Vondráček	0,20 ± 0,03
Zebín V – Vondráček	0,04 ± 0,01

U plodů zelených angreštů byl největší obsah monomerního anthokyanového pigmentu stanoven v odrůdě Prima ($0,20 \pm 0,03$ mg·100 g⁻¹) a nejnižší obsah byl pozorován v odrůdě Rixanta – V od pěstitele Vondráčka ($0,03 \pm 0,01$ mg·100 g⁻¹). Obsah anthokyanů v zelených odrůdách je dle předpokladů velmi malý, což odpovídá i závěrům z literatury, kdy bylo v zelenoplodé odrůdě naměřeno množství anthokyanů $0,074$ mg·100 g⁻¹ čerstvých plodů [94].



Graf č. 1: Celkový obsah monomerního anthokyanového pigmentu v zelenoplodých odrůdách

Porovnáním obsahu monomerního pigmentu mezi V a Keř od pěstitele Vondráčka (Tabulka č. 13), byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi těmito pěstitelskými tvary u odrůdy Rixanta. Rozdíl je natolik velký, že byl pravděpodobně způsoben analýzou nezralých plodů sklizených ze tvaru Keř. U ostatních odrůd nebylo možné porovnání obou tvarů z důvodu nedodání daných vzorků. Stejným způsobem byly porovnány oba tvary (V a Keř) z Holovous (Tabulka č. 14), kde nebyl zjištěn statistický významný rozdíl.

Dále byl porovnáván obsah monomerního pigmentu u pěstitelského tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous, kde byla nalezena shoda mezi oběma výsledky (Tabulka č. 15). Z toho lze usoudit, že různá pěstitelská stanoviště neměla vliv na obsah monomerního pigmentu u pěstitelského tvaru V. Srovnány byly rovněž i obsahy anthokyanů v modifikaci Keř od pěstitele Vondráčka a z Holovous (Tabulka č. 16), kde rozdíl mezi jednotlivými obsahy je patrný. Rozdíl mezi obsahy anthokyanů u pěstitelského tvaru Keř z různých stanovišť, mohl být způsoben odlišnou zralostí plodů. Tato srovnání mohla být provedena pouze u odrůdy Rixanta.

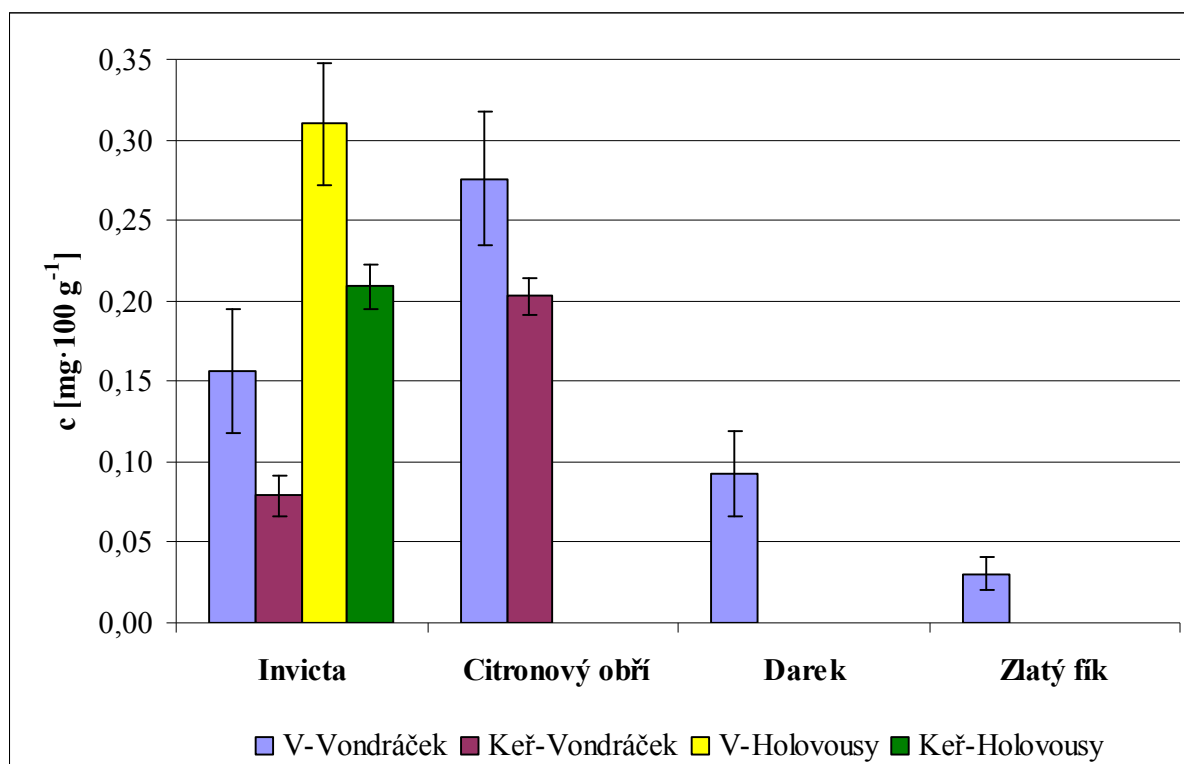
5.1.2 Žlutoplodé odrůdy

U žlutoplodých odrůd byl dle předpokladů pozorován nepatrně vyšší obsah anthokyanů než u zelených odrůd. Kompletní sadu vzorků k analýze poskytovala pouze odrůda Invicta, kde mohly být srovnány obsahy monomerního pigmentu z hlediska různých tvarů i pěstitelských stanovišť.

Tabulka č. 11: Vypočítané hodnoty celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu v plodech žlutoplodého angreštu

Žlutoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g⁻¹]
Invicta V – Vondráček	0,16±0,04
Invicta Keř – Vondráček	0,08±0,01
Invicta V – Holovousy	0,31±0,04
Invicta Keř – Holovousy	0,21±0,01
Citronový obří V – Vondráček	0,28±0,04
Citronový obří Keř – Vondráček	0,20±0,01
Darek V – Vondráček	0,09±0,03
Zlatý fík V – Vondráček	0,03±0,01

Největší obsah monomerního pigmentu má odrůda Invicta ve tvaru V z Holovous (0,31±0,04 mg·100 g⁻¹) a nejnižší obsah má odrůda Zlatý fík (0,03±0,01 mg·100 g⁻¹). Žlutoplodé odrůdy angreštu již obsahují více monomerního pigmentu než zelenoplodé odrůdy. Námi naměřené hodnoty jsou trochu nižší než hodnota 0,44 mg·100 g⁻¹, kterou uvádí odborná literatura [81]. Tato hodnota ovšem byla naměřena u tmavě žluté odrůdy, která díky své tmavší barvě může obsahovat více anthokyanů než námi měřené žlutoplodé odrůdy.



Graf č. 2: Celkový obsah monomerního anthokyanového pigmentu v žlutoplodých odrůdách

Z grafu vyplývá, že u odrůdy Invicta a Citronový obří je vyšší obsah monomerního anthokyanového pigmentu u pěstitelského tvaru V.

U odrůdy Invicta a Citronový obří pocházející od pěstitele Vondráčka byla porovnána shodnost výsledků celkového obsahu monomerního pigmentu mezi pěstitelskými tvary V a Keř (Tabulka č. 13). U ostatních odrůd porovnání nebylo možné, z důvodu chybějících vzorků. Obdobně byl porovnán obsah anthokyanů mezi V a Keř pocházející z Holovous (Tabulka č. 14), což se týkalo pouze odrůdy Invicta. Ze statistického hlediska byl ve všech případech rozdíl mezi tvarem V a Keř vyhodnocen jako nevýznamný, z toho můžeme usoudit, že tvar keře nemá významný vliv na množství anthokyanového pigmentu.

Porovnáním obsahu monomerního anthokyanového pigmentu u pěstitelského tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous (Tabulka č. 15) nebyl nalezen statistický významný rozdíl. Oproti tomu porovnáním obsahu anthokyanů u tvaru Keř od pěstitele Vondráčka a z Holovous (Tabulka č. 16) byl rozdíl zhodnocen jako statistický významný, tudíž různá pěstitelská stanoviště mají vliv na celkový obsah monomerního anthokyanového pigmentu. Vyšší obsah monomerního pigmentu byl naměřen u vzorků pocházejících z Holovous, což mohlo být způsobeno různým stupněm zralosti. Plody pocházející od pěstitele Vondráčka byly sesbírány dříve než ty z Holovous a nemusely tak být dostatečně zralé.

5.1.3 Červenoplodé odrůdy

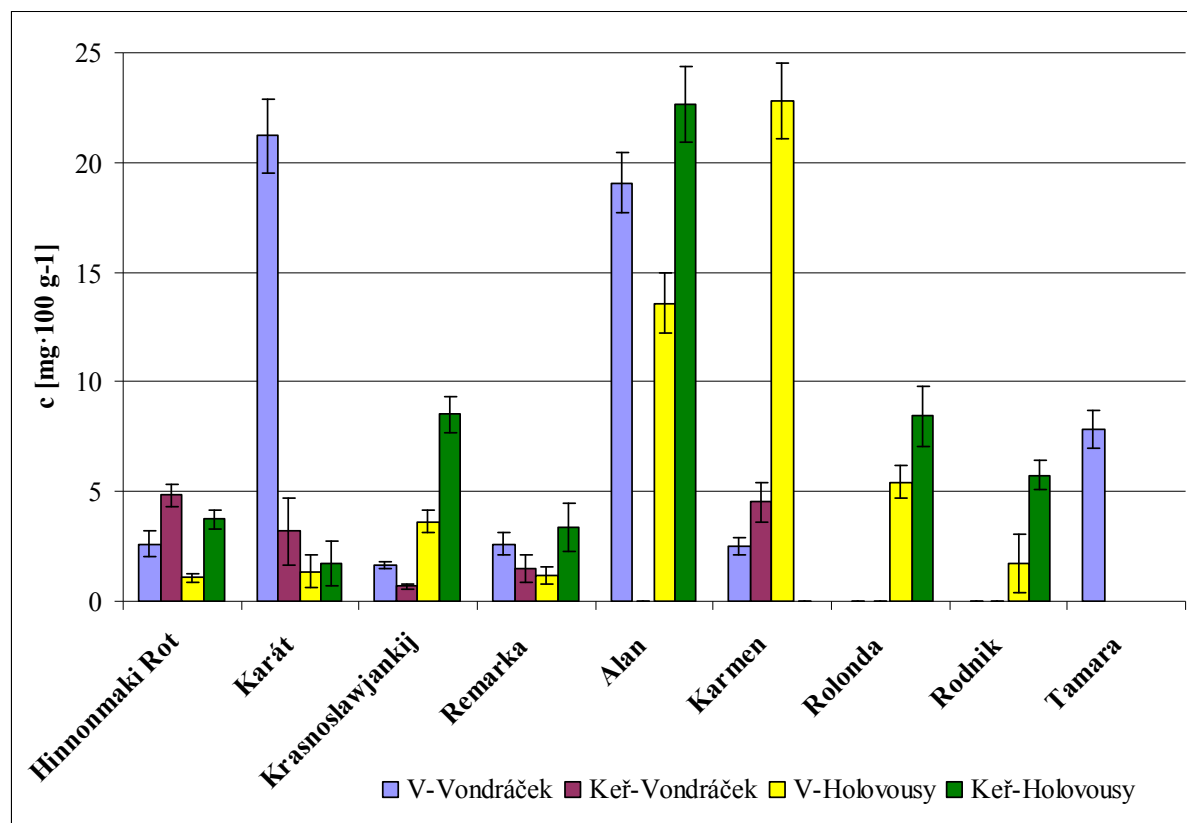
Následující *Tabulka č. 12* ukazuje všechny analyzované vzorky, kompletní sada vzorků byla pouze u odrůd Hinnonmaki Rot, Karát, Krasnoslawjankij a Remarka.

Tabulka č. 12: Vypočítané hodnoty celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu v plodech červenoplodého angreštu

Červenoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g ⁻¹]
Hinnonmaki Rot V – Vondráček	2,61 ± 0,57
Hinnonmaki Rot Keř – Vondráček	4,84 ± 0,50
Hinnonmaki Rot V – Holovousy	1,06 ± 0,21
Hinnonmaki Rot Keř – Holovousy	3,74 ± 0,43
Karát V – Vondráček	21,22 ± 1,67
Karát Keř – Vondráček	3,19 ± 1,55
Karát V – Holovousy	1,36 ± 0,77
Karát Keř – Holovousy	1,70 ± 1,00
Krasnoslawjankij V – Vondráček	1,66 ± 0,15
Krasnoslawjankij Keř – Vondráček	0,67 ± 0,14
Krasnoslawjankij V – Holovousy	3,62 ± 0,52
Krasnoslawjankij Keř – Holovousy	8,50 ± 0,79
Remarka V – Vondráček	2,59 ± 0,51
Remarka Keř – Vondráček	1,49 ± 0,62
Remarka V – Holovousy	1,17 ± 0,38
Remarka Keř – Holovousy	3,37 ± 1,08
Alan V – Vondráček	19,07 ± 1,39
Alan V – Holovousy	13,57 ± 1,38
Alan K – Holovousy	22,66 ± 1,92
Karmen V – Vondráček	2,50 ± 0,38
Karmen Keř – Vondráček	4,52 ± 0,87
Karmen V – Holovousy	22,81 ± 1,73
Rolonda V - Holovousy	5,45 ± 0,74
Rolonda Keř – Holovousy	8,77 ± 1,38
Rodnik V – Holovousy	1,73 ± 1,31
Rodnik Keř – Holovousy	5,74 ± 0,66
Tamara V – Vondráček	7,83 ± 0,85

U červenoplodých odrůd byl nejvyšší obsah monomerního anthokyanového pigmentu stanoven v odrůdě Karmen – V z Holovous (22,81 ± 1,73 mg·100 g⁻¹) a nejnižší obsah v odrůdě Krasnoslawjankij – Keř od pěstitele Vondráčka (0,67 ± 0,14 mg·100 g⁻¹). Vysoký obsah byl stanoven také u odrůdy Alan z obou pěstitelských stanovišť a odrůdy Karát – V od Vondráčka. Obsah anthokyanů u ostatních odrůd se nejčastěji pohyboval

v rozmezí hodnot od 1,17 do 8,77 mg·100 g⁻¹. Červenoplodé odrůdy obsahují dle předpokladu podstatně vyšší množství anthokyanů než předchozí odrůdy. Velký rozsah naměřených hodnot přibližně odpovídá rozsahu hodnot stanoveného v odborné literatuře 3,60 – 26,76 mg·100 g⁻¹ [52].



Graf č. 3: Celkový obsah monomerního pigmentu v červenoplodých odrůdách

V Grafu č. 3 lze vidět, že celkový obsah monomerního pigmentu je u vzorků od pěstitele Vondráčka vyšší ve tvaru Keř u odrůd Hinnonmaki Rot a Karmen. Zbytek odrůd od pěstitele Vondráčka má vyšší obsah monomerního pigmentu v modifikaci V. U všech odrůd z Holovous byl pozorován vyšší obsah monomerního pigmentu u tvaru Keř.

Pomocí Lordova testu byly statisticky porovnány shodnosti výsledků celkového obsahu monomerního pigmentu mezi tvarem V a Keř od pěstitele Vondráčka (Tabulka č. 13). Shodnost byla prokázána u odrůd Hinnonmaki Rot, Remarka a Karmen naopak statisticky významný rozdíl byl pozorován u odrůd Karát a Krasnoslawjankij. Porovnáním shodnosti výsledků obsahu anthokyanů mezi V a Keř z Holovous (Tabulka č. 14), byla pozorována shoda u všech odrůd kromě odrůd Hinnonmaki Rot a Krasnoslawjankij.

Test shodnosti výsledků obsahu monomerního pigmentu u tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous (Tabulka č. 15), prokázal shodnost výsledků u odrůd Hinnonmaki Rot, Remarka a Karmen. U odrůd Karát, Krasnoslawjankij a Karmen byl pozorován statistický významný rozdíl mezi výsledky, tudíž na obsah monomerního pigmentu mohlo mít vliv pěstitelské stanoviště.

Srovnáním výsledků obsahu monomerního pigmentu u tvaru Keř od obou pěstitelů (Tabulka č. 16), byla shoda pozorována u všech odrůd kromě odrůdy Krasnoslawjankij. Případné rozdíly mohly být pravděpodobně způsobeny různými klimatickými či výživovými podmínkami na obou stanovištích.

5.1.4 Statistické zpracování celkového obsahu monomerního pigmentu

Následující tabulky uvádějí statistické zhodnocení celkového obsahu anthokyanů v analyzovaných angreštích. Úkolem bylo porovnat shodnost výsledků obsahu anthokyanů z hlediska různých pěstitelských tvarů (V a Keř) a odlišných pěstitelů (Vondráček a Holovousy). Jsou-li výsledky shodné, pak neexistuje statisticky významný rozdíl mezi stanoveními, a pokud jsou výsledky neshodné tak je tento rozdíl statisticky významný. Pak můžeme říci, že odlišný tvar keře či různé pěstitelské stanoviště má vliv na obsah anthokyanů v daných odrůdách angreštu.

Tabulka č. 13: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu mezi V a Keř od pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	1,83	Výsledky nejsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,73	Výsledky jsou shodné
Citronový obří	0,66	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,96	Výsledky jsou shodné
Karát	2,75	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	1,59	Výsledky nejsou shodné
Remarka	0,45	Výsledky jsou shodné
Karmen	0,77	Výsledky jsou shodné

Z Tabulky č. 13 vyplývá, že byla prokázána shoda výsledků mezi V a Keř u odrůd Invicta, Citronový obří, Hinnonmaki Rot, Remarka a Karmen. U zbylých odrůd byl prokázán statisticky významný rozdíl. Lze říci, že odlišný tvar keře má vliv na celkový obsah monomerního pigmentu. Nejvyšší hodnota testu shodnosti byla naměřena u odrůdy Karát $u = 2,75$, tedy rozdíl mezi V a Keř činil 85 %.

Tabulka č. 14: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu mezi V a Keř z Holovous a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	0,01	Výsledky jsou shodné
Mucurines	0,53	Výsledky jsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,88	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	1,94	Výsledky nejsou shodné
Karát	0,10	Výsledky jsou shodné
Krasnoslawjankij	1,73	Výsledky nejsou shodné
Remarka	0,70	Výsledky jsou shodné
Alan	1,30	Výsledky jsou shodné
Rolonda	0,73	Výsledky jsou shodné
Rodnik	0,99	Výsledky jsou shodné

V Tabulce č. 14 je uvedeno, že testem shodnosti výsledků celkového obsahu anthokyanů ve tvaru V a Keř z Holovous byla prokázána shoda skoro u všech odrůd kromě odrůdy Hinnonmaki Rot a Krasnoslawjankij. Největší neshoda byla pozorována u odrůdy Hinnonmaki Rot $u = 1,94$, rozdíl v obsahu anthokyanů tak byl 72 %.

Tabulka č. 15: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu u tvaru V z Holovous a pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	0,12	Výsledky jsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,92	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,92	Výsledky jsou shodné
Karát	4,23	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	1,34	Výsledky nejsou shodné
Remarka	0,74	Výsledky jsou shodné
Alan	0,94	Výsledky jsou shodné
Karmen	4,47	Výsledky nejsou shodné

Lordovým testem byla prokázána shoda v obsahu anthokyanů u tvaru V z Holovous a od pěstitele Vondráčka u odrůd Rixanta, Invicta, Hinnonmaki Rot, Remarka a Alan. Největší difference byla pozorována u odrůdy Karmen $u = 4,47$, což odpovídá rozdílu 89 %.

Tabulka č. 16: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu u tvaru Keř z Holovous a pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	2,05	Výsledky nejsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	2,38	Výsledky nejsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,55	Výsledky jsou shodné
Karát	0,28	Výsledky jsou shodné
Krasnoslawjankij	3,93	Výsledky nejsou shodné
Remarka	0,51	Výsledky jsou shodné

Shodnost výsledků celkového obsahu monomerního anthokyanového pigmentu u tvaru Keř z Holovous a od Vondráčka byla pozorována u poloviny odrůd (Tabulka č. 16) – Hinnonmaki Rot, Karát a Remarka. Nejvyšší rozdíl v obsahu anthokyanů u tvaru K z obou stanovišť byl u odrůdy Krasnoslawjankij a činil 92 %.

5.2 Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

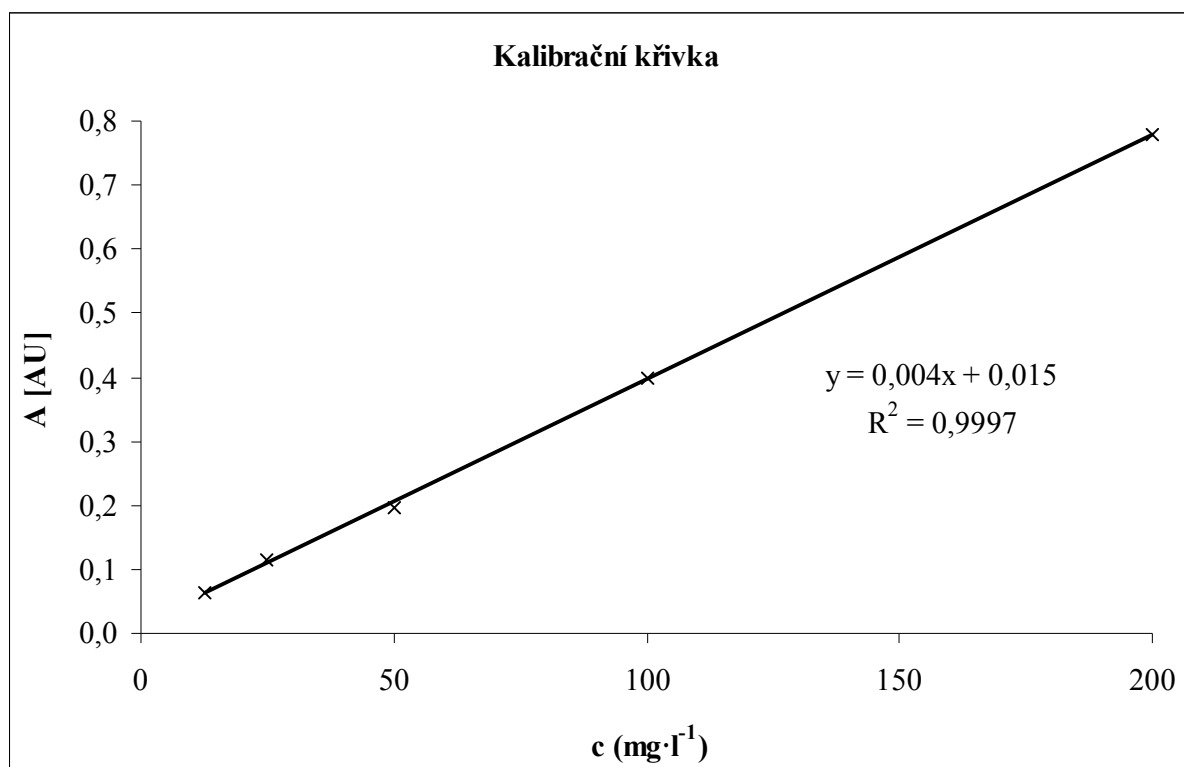
Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno podle kapitoly 3.6.3. Proměřením kalibračních roztoků kyseliny gallové byla zhotovena kalibrační křivka a z její rovnice regrese (4) byla pak vypočtena celková koncentrace polyfenolů. Každá odrůda byla analyzována třikrát a výsledky byly následně statisticky zpracovány.

Výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm interval spolehlivosti (v grafech je zobrazen jako chybová úsečka) a jsou rozděleny do jednotlivých kapitol podle barvy odrůdy.

Všechny vypočtené hodnoty celkové koncentrace polyfenolů jsou uvedeny v Příloze 2. V kapitole 4.2.4 je uvedeno statistické zpracování, kde byla porovnávána shodnost výsledků celkové koncentrace polyfenolů z hlediska různých pěstitelů (Vondráček a Holovousy) a pěstitelských tvarů (V a Keř).

Tabulka č. 17: Potřebné hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky kyseliny gallové

Koncentrace kyseliny gallové [mg · l ⁻¹]	Absorbance			
	A ₁	A ₂	A ₃	Průměr
12,5	0,064	0,064	0,060	0,063
25	0,118	0,114	0,115	0,116
50	0,196	0,199	0,197	0,197
100	0,396	0,396	0,399	0,397
200	0,763	0,777	0,795	0,778



Graf č. 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové

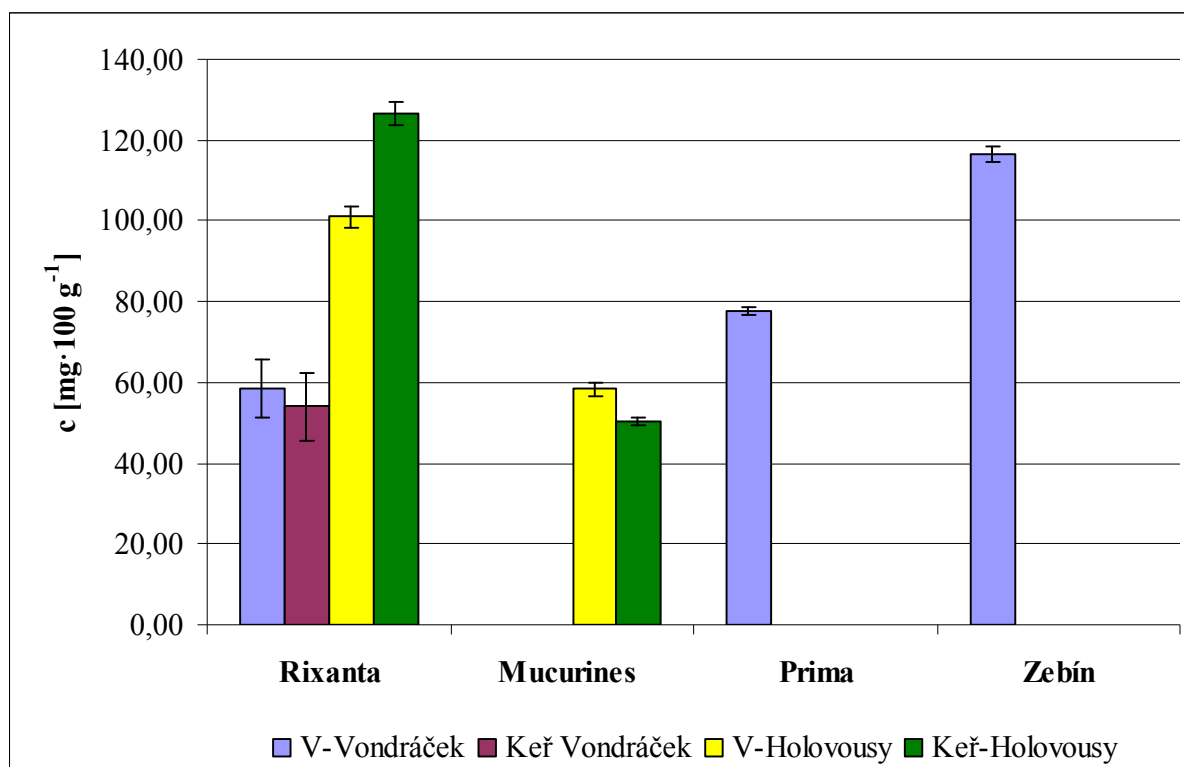
5.2.1 Zelenoplodé odrůdy

Všechny analyzované zelenoplodé odrůdy jsou uvedeny v *Tabulce č. 18*. Dostupná v kompletní sestavě byla pouze odrůda Rixanta.

Tabulka č. 18: Vypočítané hodnoty celkové koncentrace polyfenolů v zelených plodech angreštu

Zelenoplodé odrůdy	Celková koncentrace polyfenolů c [mg·100 g⁻¹]
Rixanta V – Vondráček	62,63 ± 7,24
Rixanta Keř – Vondráček	58,41 ± 8,51
Rixanta V – Holovousy	101,12 ± 2,47
Rixanta Keř – Holovousy	126,45 ± 2,73
Mucurines V – Holovousy	58,31 ± 1,71
Mucurines K – Holovousy	50,26 ± 0,94
Prima V – Vondráček	77,88 ± 0,92
Zebín V – Vondráček	116,22 ± 1,88

Celková koncentrace polyfenolů se pohybuje v širokém rozmezí, nejvyšší koncentrace byla naměřena u odrůdy Rixanta – Keř z Holovous (126,45 ± 2,73 mg·100 g⁻¹) a nejnižší u odrůdy Mucurines – Keř z Holovous (50,26 ± 0,94 mg·100 g⁻¹). Vysoký obsah obsahovala rovněž i odrůda Zebín (116,22 ± 1,88 mg·100 g⁻¹).



Graf č. 5: Celková koncentrace polyfenolů v zelenoplodých odrůdách

U odrůdy Rixanta byla zjištěna vyšší koncentrace polyfenolů u pěstitelského tvaru V. U odrůd z Holovous má vyšší koncentraci polyfenolů pěstitelský tvar Keř (u odrůdy Rixanta) a tvar V (u odrůdy Mucurines).

Statisticky byla porovnávána shodnost výsledků mezi tvarem V a Keř od pěstitele Vondráčka (*Tabulka č. 21*) a byla pozorována shoda mezi oběma tvary. Pomocí Lordova testu byla také hodnocena shodnost výsledků mezi tvarem V a Keř z Holovous (*Tabulka č. 22*) a byl zjištěn statisticky významný rozdíl u obou odrůd (Rixanta a Mucurines). Rozdíly mezi jednotlivými tvary mohly být způsobeny odlišnými podmínkami růstu či odlišnou zralostí.

Vyšší obsah polyfenolů obsahuje odrůda Rixanta pocházející z Holovous. Pomocí Lordova testu byla prověřena shodnost celkového obsahu polyfenolů u tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous (*Tabulka č. 23*) a byl pozorován statisticky významný rozdíl mezi oběma stanovišti. Lordův test byl proveden i u tvaru Keř z obou stanovišť (*Tabulka č. 24*) a byla rovněž pozorována neshoda. Rozdíl mezi celkovým obsahem polyfenolů u odrůdy Rixanta od pěstitele Vondráčka a z Holovous je dost vysoký, byl pravděpodobně způsoben odlišnou dobou sklizně.

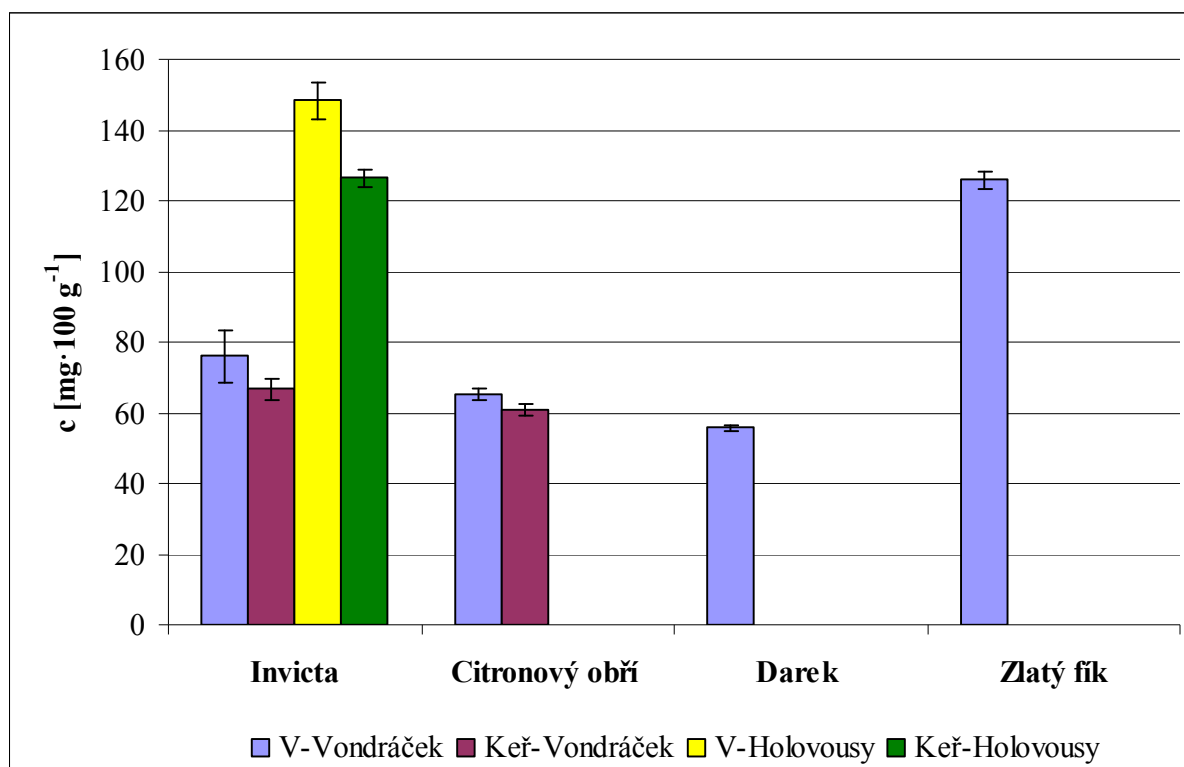
5.2.2 Žlutoplodé odrůdy

V *Tabulce č. 19* jsou uvedeny všechny odrůdy žlutého angreštu, které byly analyzovány. Pro porovnání obsahu celkové koncentrace polyfenolů v rámci různých tvarů a stanovišť byla k dispozici pouze odrůda Invicta. U odrůdy Citronový obří bylo možné jen porovnání v rámci odlišných pěstitelských tvarů.

Tabulka č. 19: Vypočítané hodnoty celkové koncentrace polyfenolů ve žlutých plodech angreštu

Žlutoplodé odrůdy	Celková koncentrace polyfenolů <i>c</i> [mg·100 g⁻¹]
Invicta V – Vondráček	75,90 ± 7,17
Invicta Keř – Vondráček	66,70 ± 2,93
Invicta V – Holovousy	148,37 ± 5,10
Invicta Keř – Holovousy	126,38 ± 2,39
Citronový obří V – Vondráček	65,26 ± 1,56
Citronový obří Keř – Vondráček	60,66 ± 1,75
Darek V – Vondráček	55,64 ± 0,62
Zlatý fík V – Vondráček	125,83 ± 2,35

Celková koncentrace polyfenolů se mezi vybranými odrůdami značně lišila. Nejnižší obsah byl naměřen u odrůdy Darek (55,64 ± 0,62 mg·100 g⁻¹), nízký obsah byl také u odrůdy Citronový obří. Více než dvojnásobné množství celkových polyfenolů obsahovala odrůda Invicta – V z Holovous (148,37 ± 5,10 mg·100 g⁻¹), vysoké množství obsahovala také odrůda Zlatý fík. Naměřené hodnoty se v některých případech značně liší od hodnoty nalezené v literatuře, která uvádí hodnotu 184,03 mg·100 g⁻¹ [81]. Obsah fenolických látek se liší v závislosti na stupni zralosti, genetice, klimatických podmínkách, podmínkách zpracování a skladování.



Graf č. 6: Celková koncentrace polyfenolů v žlutoplodých odrůdách

U odrůd pěstitele Vondráčka jsou vyšší koncentrace polyfenolů v pěstitelském tvaru V. U odrůdy Invicta z Holovous je rovněž vyšší obsah polyfenolů u pěstitelského tvaru V.

Pomocí Lordova testu, byla porovnána shodnost výsledků mezi tvary V a Keř od pěstitele Vondráčka a u obou testovaných odrůd byla zjištěna shoda. Statistickým porovnáním shodnosti výsledku u obou pěstitelských tvarů z Holovous byl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Porovnáním celkového obsahu polyfenolů u pěstitelského tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous (Tabulka č. 23), byl pozorován statisticky významný rozdíl. Lordův test pro shodnost byl proveden i u tvaru Keř od pěstitele Vondráčka a z Holovous (Tabulka č. 24), kde byla rovněž pozorována neshoda.

Odrůda Invicta pocházející z Holovous má podstatně vyšší obsah polyfenolů než od pěstitele Vondráčka. Důvodem takového rozdílu mohlo být zajištění lepších podmínek při růstu angreštu (např. optimální světlo, teplo a dostatek výživy).

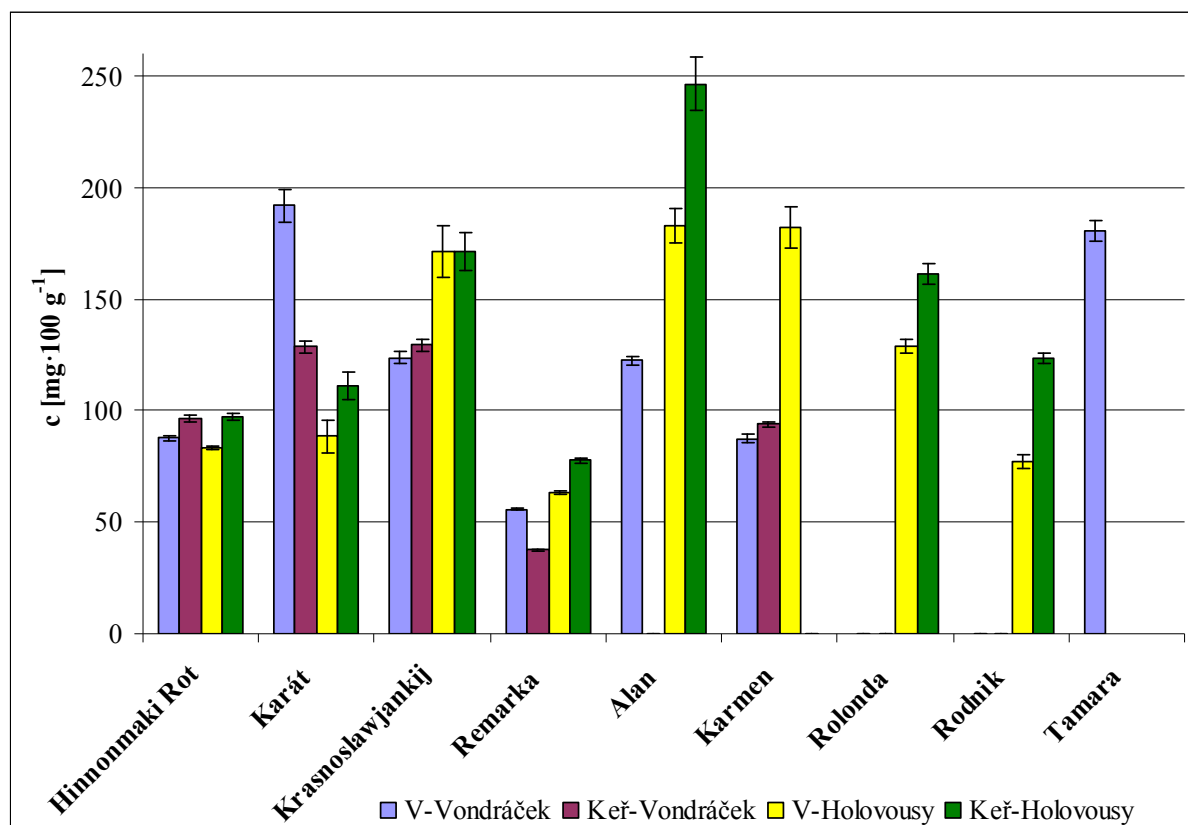
5.2.3 Červenoplodé odrůdy

V Tabulce č. 20 jsou uvedeny výsledky všech analyzovaných červených odrůd angreštu. Celkové srovnání v rámci odlišných tvarů (V a Keř) a stanovišť (Vondráček a Holovousy) bylo možné jen u čtyř odrůd a to u Hinnonmaki Rot, Karát, Krasnoslawjankij a Remarka.

Tabulka č. 20: Vypočítané hodnoty celkové koncentrace polyfenolů v červených plodech angreštu

Červenoplodé odrůdy	Celková koncentrace polyfenolů <i>c</i> [mg · 100 g ⁻¹]
Hinnonmaki Rot V – Vondráček	87,63 ± 1,33
Hinnonmaki Rot Keř – Vondráček	96,38 ± 1,23
Hinnonmaki Rot V – Holovousy	83,46 ± 0,91
Hinnonmaki Rot Keř – Holovousy	97,54 ± 1,55
Karát V – Vondráček	191,79 ± 7,14
Karát Keř – Vondráček	128,60 ± 2,53
Karát V – Holovousy	88,37 ± 7,03
Karát Keř – Holovousy	111,19 ± 6,37
Krasnoslawjankij V – Vondráček	123,58 ± 2,70
Krasnoslawjankij Keř – Vondráček	129,32 ± 2,71
Krasnoslawjankij V – Holovousy	171,13 ± 11,34
Krasnoslawjankij Keř – Holovousy	171,17 ± 8,29
Remarka V – Vondráček	55,91 ± 0,60
Remarka Keř – Vondráček	37,54 ± 0,35
Remarka V – Holovousy	63,48 ± 0,85
Remarka Keř – Holovousy	77,70 ± 1,34
Alan V – Vondráček	122,54 ± 1,85
Alan V – Holovousy	162,85 ± 7,89
Alan K – Holovousy	246,32 ± 12,05
Karmen V – Vondráček	87,47 ± 1,99
Karmen Keř – Vondráček	93,78 ± 1,15
Karmen V – Holovousy	182,13 ± 9,54
Rolonda V - Holovousy	128,89 ± 2,85
Rolonda Keř – Holovousy	161,26 ± 4,39
Rodnik V – Holovousy	77,00 ± 3,14
Rodnik Keř – Holovousy	123,40 ± 2,51
Tamara V – Vondráček	180,40 ± 4,77

Celková koncentrace polyfenolů u jednotlivých červenoplodých odrůd se značně liší. Nejvyšší obsah byl naměřen u odrůdy Alan – Keř z Holovous ($246,32 \pm 12,05 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), vysoké hodnoty byly také naměřeny u odrůdy Karát – V od Vondráčka a Tamara. Nejnižší hodnota byla naopak naměřena u odrůdy Remarka – Keř od Vondráčka ($37,54 \pm 0,35 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Některé námi stanovené hodnoty se přibližují hodnotě z odborné literatury, $191 \pm 17 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ [56] v jiné publikaci se můžeme setkat také s hodnotou $196,98 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ [81].



Graf č. 7: Celková koncentrace polyfenolů v červenoplodých odrůdách

Z Grafu č. 7 lze vyčíst, že celková koncentrace polyfenolů je ve většině případů vyšší u pěstitelského tvaru Keř, než u tvaru V. Není tomu tak pouze u odrůd Karát a Remarka od pěstitele Vondráčka.

Pomocí Lordova testu byla porovnána shodnost výsledků celkové koncentrace polyfenolů mezi tvarem V a Keř od pěstitele Vondráčka (Tabulka č. 21). Shoda byla prokázána u odrůd Krasnoslawjankij a Karmen, naopak statisticky významný rozdíl byl u odrůd Hinnonmaki Rot, Karát a Remarka. Porovnáním shodnosti výsledků mezi V a Keř z Holovous (Tabulka č. 22) byla shoda pozorována pouze u odrůdy Karát a Krasnoslawjankij, u ostatních odrůd byl statisticky významný rozdíl.

Byly srovnány hodnoty celkové koncentrace polyfenolů u pěstitelského tvaru V od Vondráčka a z Holovous. (Tabulka č. 23), shoda byla pozorována pouze u odrůdy Hinnonmaki Rot. U ostatních odrůd je statisticky významný rozdíl, tudíž celková koncentrace polyfenolů závisí na stanovišti. Test shodnosti výsledků u tvaru Keř od pěstitele Vondráčka

a z Holovous (*Tabulka č. 24*), prokázal shodnost výsledků u odrůd Hinnonmaki Rot a Karát, u odrůd Krasnoslawjankij a Remarka byla pozorována neshoda. Nelze s jistotou říci, které stanoviště (Vondráček či Holovousy) bylo lepší. Rozdíl mohl být způsoben jinými podmínkami růstu (odlišné klimatické či půdní podmínky).

5.2.4 Statistické zpracování

Následující tabulky obsahují porovnání shodnosti výsledků koncentrací celkových polyfenolů pomocí Lordova testu (u). Srovnávány jsou jednotlivé obsahy v rámci odlišných tvarů keře (V a Keř) a různých pěstitelů (Vondráček a Holovousy). Hodnoty jsou porovnávány s tabelovanou hodnotou $u_{krit} = 1,304$ na hladině významnosti 0,05. Je-li hodnota Lordova testu vyšší než tabelovaná jsou výsledky neshodné, v opačném případě považujeme výsledky za shodné a neexistuje tak mezi naměřenými hodnotami statistický významný rozdíl.

Tabulka č. 21: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků koncentrací celkových polyfenolů mezi V a Keř od pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	0,15	Výsledky jsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,45	Výsledky jsou shodné
Citronový obří	0,64	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	1,60	Výsledky nejsou shodné
Karát	2,77	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	0,49	Výsledky jsou shodné
Remarka	9,51	Výsledky nejsou shodné
Karmen	0,93	Výsledky jsou shodné

Lordovým testem byla prokázána shodnost výsledků mezi V a Keř od pěstitele Vondráčka u odrůd Rixanta, Invicta, Mucurines, Krasnoslawjankij a Karmen. Nejvyšší statisticky významný rozdíl byl pozorován u odrůdy Remarka $u = 9,51$, kde rozdíl mezi koncentracemi polyfenolů činil 32 %.

Tabulka č. 22: Hodnoty Lordova testu pro porovnání shodnosti výsledků koncentrací celkových polyfenolů mezi V a Keř z Holovous a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	2,28	Výsledky nejsou shodné
Mucurines	1,42	Výsledky nejsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	1,37	Výsledky nejsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	2,66	Výsledky nejsou shodné
Karát	0,85	Výsledky jsou shodné
Krasnoslawjankij	0,01	Výsledky jsou shodné
Remarka	3,04	Výsledky nejsou shodné
Alan	1,50	Výsledky nejsou shodné
Rolonda	2,08	Výsledky nejsou shodné
Rodnik	4,01	Výsledky nejsou shodné

Shodnost výsledků celkové koncentrace polyfenolů mezi tvarem V a Keř byla pozorována pouze u odrůd Karát a Krasnoslawjankij u ostatních byl prokázán statisticky významný rozdíl. Z tohoto tvrzení vyplývá, že na obsah polyfenolů v angreštu by mohl mít významný vliv tvar keře. Nejvyšší rozdíl v obsahu polyfenolů mezi tvarem V a Keř byl u odrůdy Rodnik a činil 38 %.

Tabulka č. 23: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků koncentrací celkových polyfenolů u tvaru V z Holovous a pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	2,19	Výsledky nejsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	2,87	Výsledky nejsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,87	Výsledky jsou shodné
Karát	3,30	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	1,57	Výsledky nejsou shodné
Remarka	2,56	Výsledky nejsou shodné
Alan	2,90	Výsledky nejsou shodné
Karmen	4,14	Výsledky nejsou shodné

Lordovým testem byla prokázána shoda v koncentraci celkových polyfenolů u tvaru V od obou pěstitelů pouze u odrůdy Hinnonmaki Rot. Největší hodnota Lordova testu byla pozorována u odrůdy Karmen $u = 4,14$, což představuje rozdíl 52 %.

Tabulka č. 24: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků koncentrací celkových polyfenolů u tvaru Keř z Holovous a pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	3,20	Výsledky nejsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	5,25	Výsledky nejsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,20	Výsledky jsou shodné
Karát	0,95	Výsledky jsou shodné
Krasnoslawjankij	1,76	Výsledky nejsou shodné
Remarka	11,00	Výsledky nejsou shodné

V Tabulce č. 24 lze pozorovat porovnání shodnosti obsahu celkových polyfenolů u tvaru Keř od pěstitele Vondráčka a z Holovous. Shoda mezi naměřenými hodnotami byla pozorována pouze u odrůd Hinnonmaki Rot a Karát, u ostatních odrůd je statisticky významný rozdíl. Největší neshoda byla pomocí Lordova testu stanovena u odrůdy Remarka $u = 11,00$, což je zhruba 52 %.

5.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC

Postup pro stanovení celkového obsahu kyseliny askorbové je uveden v kapitole 3.7.4. Z každé odrůdy byly vždy připraveny tři vzorky a každý byl třikrát nastříknut do chromatografu. Vlastní analýza probíhala 4 minuty, poté následovalo proplachování kolony 8 minut. Kyselina askorbová eluovala krátce po druhé minutě, což je vidět na chromatogramu v Příloze č. 3. Pomocí softwaru Brezee byla provedena integrace píků kyseliny askorbové a naměřené hodnoty ploch píků spolu s hodnotami koncentrací kyseliny askorbové [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$] jsou uvedeny v Příloze č. 4.

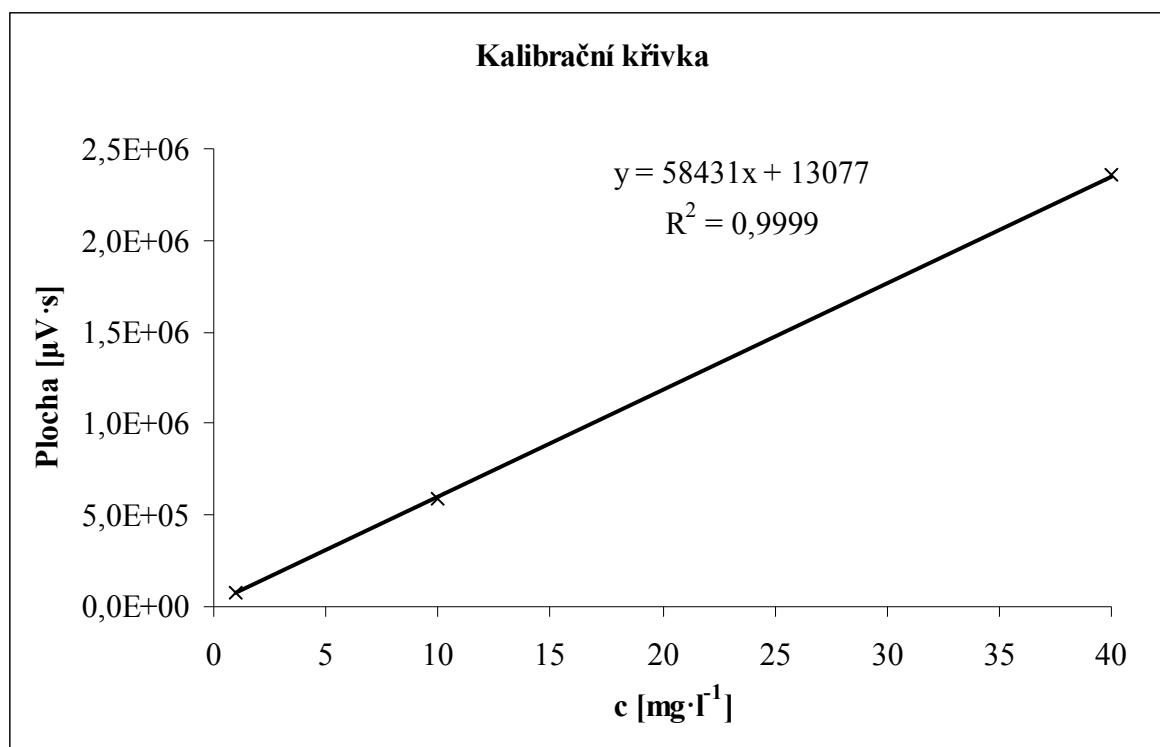
Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota koncentrace kyseliny askorbové ze všech tří měření [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ plodů}$] \pm interval spolehlivosti. V kapitole 4.3.4 jsou statisticky porovnány shodnosti výsledků z hlediska různých pěstitelů (Vondráček a Holovousy) a pěstitelských tvarů (V a Keř).

5.3.1 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení vitamínu C metodou HPLC

Postup přípravy kalibračních roztoků je uveden v kapitole 3.7.1. Každý standardní roztok kalibrační křivky o koncentracích 1, 10 a 40 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byl třikrát nastříknut do chromatografu. Samotná analýza probíhala 3,5 minuty. Proměřením kalibračních roztoků byla sestrojena kalibrační křivka a z její rovnice regrese, pak byla vypočítána koncentrace kyseliny askorbové $[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$. Kalibrační křivka byla proměřena vždy s novou mobilní fází.

Tabulka č. 25: Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Koncentrace kyseliny askorbové $[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	Plocha píku $[\mu\text{V} \cdot \text{s}]$			
	1.	2.	3	Průměr
1	85650	80148	72222	79340
10	560279	581963	619363	587202
40	2313296	2379531	2365137	2352655



Graf č. 8: Kalibrační křivka kyseliny askorbové

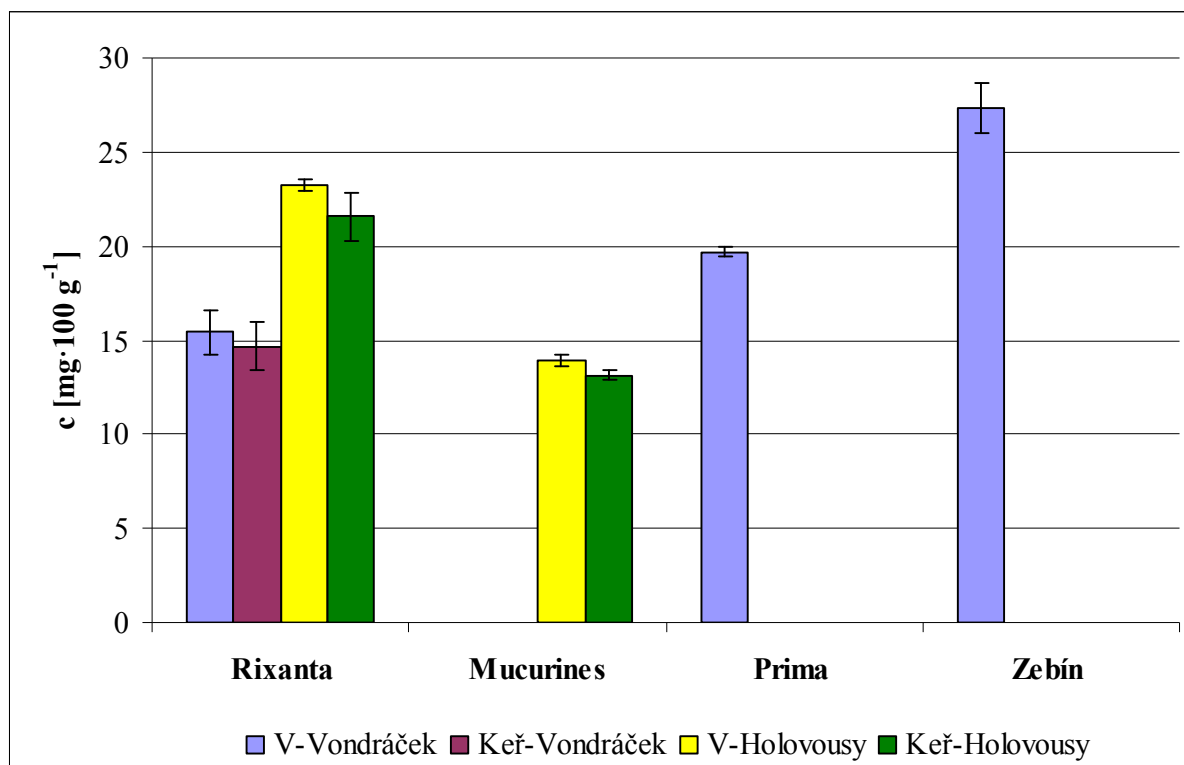
5.3.2 Stanovení vitamínu C v zelenoplodých odrůdách

Celkový obsah kyseliny askorbové v zelených odrůdách angreštu stanovený pomocí HPLC uvádí následující *Tabulka č. 26*. Vypočítané hodnoty jsou uváděny v mg na 100 g plodů. Na celkový obsah vitamínu C byla analyzována kompletní sada vzorků pouze u odrůdy Rixanta.

Tabulka č. 26: Celkový obsah kyseliny askorbové v zelenoplodých odrůdách

Zelenoplodé odrůdy	Celkový obsah kyseliny askorbové [mg·100 g ⁻¹]
Rixanta V – Vondráček	15,4±1,2
Rixanta Keř – Vondráček	14,7±1,3
Rixanta V – Holovousy	23,2±0,4
Rixanta Keř – Holovousy	21,6±1,3
Mucurines V – Holovousy	13,9±0,3
Mucurines K – Holovousy	13,1±0,2
Prima V – Vondráček	19,7±0,3
Zebín V – Vondráček	27,3±1,3

Nejvyšší obsah kyseliny askorbové byl naměřen u odrůdy Zebín (27,3±1,3 mg·100 g⁻¹), nejmenší naopak u odrůdy Mucurines – K z Holovous (13,1±0,2 mg·100 g⁻¹). Námi naměřené obsahy vitamínu C se přibližují k hodnotě, která je uvedena v literatuře 24,4 mg·100 g⁻¹ čerstvých plodů [46].



Graf č. 9: Celkový obsah kyseliny askorbové v zelenoplodých odrůdách

U odrůdy Rixanta od pěstitele Vondráčka bylo pozorováno vyšší množství kyseliny askorbové u pěstitelského tvaru V. Statistickým porovnáním shodnosti výsledků mezi oběma tvary V a K od Vondráčka (*Tabulka č. 29*) byla nalezena shoda. Stejně tomu tak bylo srovnáním výsledků mezi tvary V a K z Holovous (*Tabulka č. 30*). Z toho můžeme soudit, že u zelenoplodých odrůd nemá pěstitelský tvar angreštu vliv na obsah vitamínu C.

Na základě Lordova testu byl pozorován statisticky významný rozdíl v obsahu vitamínu C u tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous (*Tabulka č. 31*). Obsah kyseliny askorbové byl výrazně vyšší u odrůdy z Holovous, kde byly zřejmě lepší optimální podmínky pro růst. Lordův test byl také proveden u tvaru Keř z obou pěstitelských stanovišť (*Tabulka č. 32*) a nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

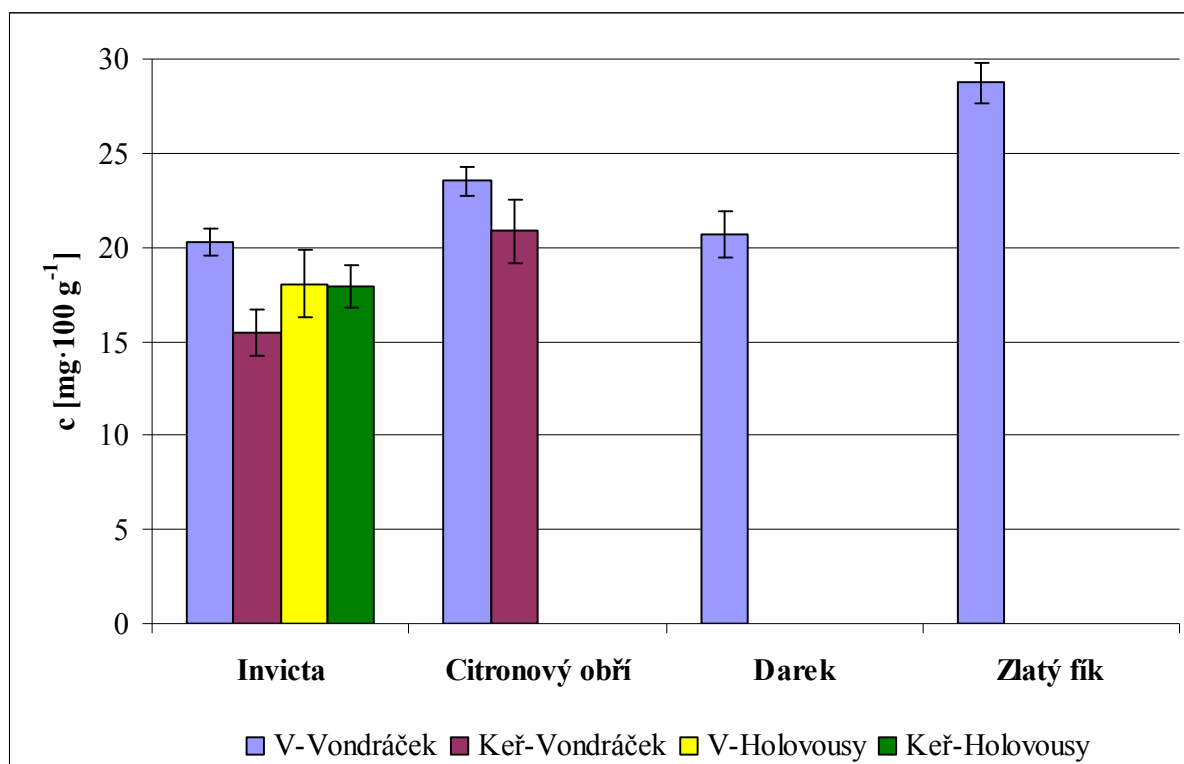
5.3.3 Stanovení vitamínu C ve žlutoplodých odrůdách

V *Tabulce č. 27* jsou uvedeny vypočítané hodnoty celkového obsahu kyseliny askorbové stanovené pomocí HPLC ve žlutoplodých odrůdách angreštu. Kompletní sada vzorků byla analyzována pouze u odrůdy Invicta a mohlo tak být provedeno zhodnocení obsahu vitamínu C z hlediska různých tvarů a pěstitelů.

Tabulka č. 27: Celkový obsah kyseliny askorbové ve žlutoplodých odrůdách

Žlutoplodé odrůdy	Celkový obsah kyseliny askorbové [mg·100 g⁻¹]
Invicta V – Vondráček	20,3 ± 0,7
Invicta Keř – Vondráček	15,5 ± 1,2
Invicta V – Holovousy	18,0 ± 1,8
Invicta Keř – Holovousy	17,9 ± 1,1
Citronový obří V – Vondráček	23,5 ± 0,8
Citronový obří Keř – Vondráček	20,9 ± 1,7
Zlatý fík V – Vondráček	28,7 ± 1,1
Darek V – Vondráček	20,7 ± 1,2

Hodnoty kyseliny askorbové v analyzovaných plodech vybraných odrůd žlutého angreštu se pohybovaly v rozmezí hodnot od 15,5 ± 1,2 do 28,7 ± 1,1 mg·100 g⁻¹ plodů. Nejvyšší množství vitamínu C bylo stanoveno u odrůdy Zlatý fík a nejnižší množství obsahovala odrůda Invicta – Keř od pěstitele Vondráčka. Námi naměřené hodnoty se pohybují kolem hodnoty uvedené v odborné literatuře 20,3 ± 1,5 mg·100 g⁻¹ čerstvých plodů [95].



Graf č. 10: Celkový obsah kyseliny askorbové ve žlutoplodých odrůdách

U odrůd pěstitele Vondráčka je vyšší koncentrace kyseliny askorbové v pěstitelském tvaru V. U odrůdy Invicta z Holovous byl rovněž pozorován vyšší obsah u tvaru V.

Statisticky byla porovnána shodnost výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové mezi tvarem V a Keř od Vondráčka (*Tabulka č. 28*). Shoda byla prokázána u obou odrůd. Statistickým porovnáním shodnosti výsledků mezi oběma tvary z Holovous (*Tabulka č. 29*) byla u odrůdy Invicta pozorována shoda. Z čehož lze usoudit, že tvar keře nemá významný vliv na obsah kyseliny askorbové ve žlutoplodých odrůdách.

Pomocí Lordova testu byl také zhodnocen rozdíl v obsahu kyseliny askorbové u tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous (*Tabulka č. 30*). Rozdíl byl vyhodnocen jako statisticky nevýznamný. U porovnání shodnosti výsledků u tvaru Keř od Vondráčka a z Holovous (*Tabulka č. 31*) byla taktéž pozorována shoda mezi oběma výsledky. Lze tedy odvodit, že pěstitelské stanoviště nemělo vliv na obsah vitamínu C v plodech angreštu.

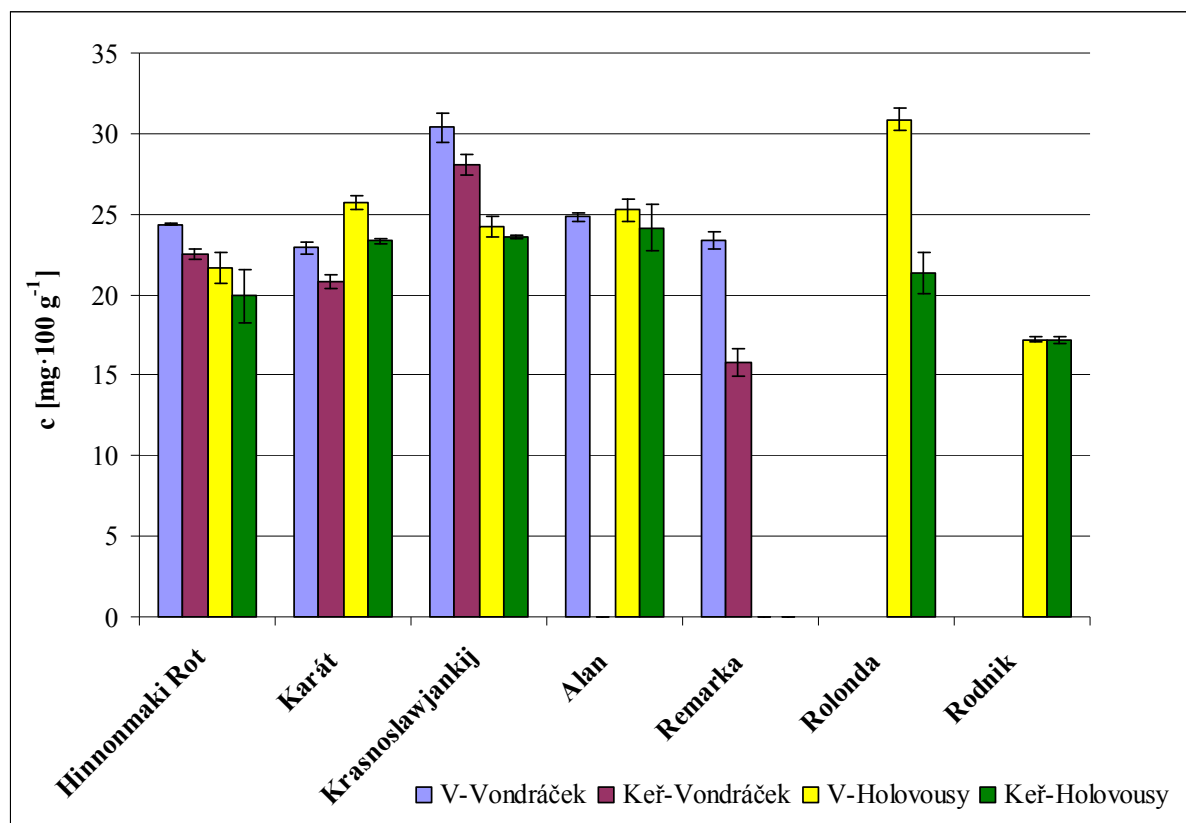
5.3.4 Stanovení vitaminu C v červenoplodých odrůdách

Tabulka č. 28 shrnuje vypočítané hodnoty celkového obsahu vitaminu C v červených odrůdách angreštu. Kompletní sada ke stanovení byla pouze u odrůd Hinnonmaki Rot, Karát, a Krasnoslawjankij. Odrůdy Karmen, Remarka z Holovous a Tamara nebyly analyzovány na obsah vitaminu C z důvodu nedostatku vzorku.

Tabulka č. 28: Celkový obsah kyseliny askorbové v červenoplodých odrůdách

Červenoplodé odrůdy	Celkový obsah kyseliny askorbové [mg·100 g ⁻¹]
Hinnonmaki Rot V – Vondráček	24,4±0,1
Hinnonmaki Rot Keř – Vondráček	22,5±0,3
Hinnonmaki Rot V – Holovousy	21,7±0,9
Hinnonmaki Rot Keř – Holovousy	19,9±1,7
Karát V – Vondráček	22,9±0,4
Karát Keř – Vondráček	20,8±0,4
Karát V – Holovousy	25,7±0,4
Karát Keř – Holovousy	23,4±0,1
Krasnoslawjankij V – Vondráček	30,4±0,9
Krasnoslawjankij Keř – Vondráček	28,0±0,6
Krasnoslawjankij V – Holovousy	24,2±0,6
Krasnoslawjankij Keř – Holovousy	23,6±0,1
Alan V – Vondráček	24,8±0,7
Alan V – Holovousy	25,3±1,4
Alan K – Holovousy	24,2±0,3
Remarka V – Vondráček	23,4±0,5
Remarka Keř – Vondráček	15,8±0,8
Rolonda V – Holovousy	30,9±0,7
Rolonda Keř – Holovousy	21,4±1,3
Rodnik V – Holovousy	17,2±0,2
Rodnik Keř – Holovousy	17,1±0,2

Celkový obsah kyseliny askorbové u červenoplodých odrůd se pohybuje v rozmezí 30,9 – 15,8 mg·100 g⁻¹. Nejvyšší obsah vitaminu C v plodech pocházejících z Holovous byl stanoven u odrůdy Rolonda – V (30,9±0,7 mg·100 g⁻¹) a nejnižší obsah byl u odrůdy Rodnik – Keř (17,1±0,2 mg·100 g⁻¹). V plodech od pěstitele Vondráčka byl nejvyšší obsah kyseliny askorbové pozorován u odrůdy Krasnoslawjankij – V (30,4±0,9 mg·100 g⁻¹), naopak nejnižší obsah byl naměřen u odrůdy Remarka – Keř (15,8±0,8 mg·100 g⁻¹). Námi naměřené hodnoty přibližně odpovídají hodnotě uvedené v literatuře 25,4±2,6 mg·100 g⁻¹ čerstvých plodů, která byla stanovena u červenoplodé odrůdy Whinham's Industry.



Graf č. 11: Celkový obsah kyseliny askorbové v červenoplodých odrůdách

V Grafu č. 11 lze pozorovat u všech odrůd vyšší množství kyseliny askorbové u pěstitelského tvaru V. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že u tvaru V jsou ponechány jen dvě základní větve a oproti tvaru Keř, tak mají plody více prostoru pro růst, více slunečního světla a čerpají větší množství výživy. Keř má více větví a sklídí se z něj větší množství menších plodů, které taky mohou obsahovat menší množství kyseliny askorbové.

Pomocí Lordova testu (*u*) byla porovnána shodnost výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové mezi tvarem V a Keř od Vondráčka (Tabulka č. 29). Shoda byla pozorována u odrůd Karát a Krasnoslawjankij, naopak u odrůd Hinnonmaki Rot a Remarka byl prokázán statisticky významný rozdíl. Stejným způsobem byla také porovnána shodnost u odrůd z Holovous (Tabulka č. 30), shoda výsledků mezi V a Keř byla pozorována u odrůd Hinnonmaki Rot, Krasnoslawjankij, Alan a Rodnik. Neshodné výsledky byly u odrůd Karát a Rolonda. U výsledků, kde byla prokázána neshoda, lze říci, že tvar keře má vliv na obsah kyseliny askorbové.

Dále byly také porovnány shodnosti výsledků u pěstitelského tvaru V z Holovous a od pěstitele Vondráčka (Tabulka č. 31), shoda byla pozorována u odrůd Hinnonmaki Rot a Alan. U ostatních odrůd je mezi výsledky statisticky významný rozdíl. Pomocí Lordova testu shodnosti byl také zhodnocen rozdíl v obsahu vitamínu C u tvaru Keř od obou pěstitelů (Tabulka č. 32), kde byla nalezena shoda u odrůdy Hinnonmaki Rot. U odrůd Karát a Krasnoslawjankij byla pozorována neshoda.

5.3.5 Statistické zpracování

Následující tabulky obsahují statistické porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové v jednotlivých odrůdách angreštu pomocí Lordova testu (u). Úkolem bylo porovnat jednotlivé obsahy vitamínu C v rámci různých tvarů (V a Keř) a různých pěstitelských stanovišť (Vondráček a Holovousy). Výsledky jsou shodné, pokud je hodnota Lordova testu (u) menší než tabelovaná hodnota $u_{krit.} = 1,304$, pokud je u větší jedná se o neshodu a je mezi výsledky pozorován statisticky významný rozdíl.

Tabulka č. 29: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové mezi Keř a V od pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	0,14	Výsledky jsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	1,24	Výsledky jsou shodné
Citronový obří	0,53	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	2,84	Výsledky nejsou shodné
Karát	1,27	Výsledky jsou shodné
Krasnoslawjankij	0,71	Výsledky jsou shodné
Remarka	2,66	Výsledky nejsou shodné

Pomocí Lordova testu byla prokázána shodnost výsledků mezi V a Keř od Vondráčka u odrůd Rixanta, Invicta, Citronové obří, Karát a Krasnoslawjankij. Nejvyšší hodnota Lordova testu $u = 2,84$ byla pozorována u odrůdy Hinnonmaki Rot, kde rozdíl mezi obsahem kyseliny askorbové činil zhruba 8 %.

Tabulka č. 30: Hodnoty Lordova testu pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové Keř a V z Holovous a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	0,47	Výsledky jsou shodné
Mucurines	0,66	Výsledky jsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,02	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,33	Výsledky jsou shodné
Karát	1,98	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	0,42	Výsledky jsou shodné
Alan	0,34	Výsledky jsou shodné
Rolonda	2,26	Výsledky nejsou shodné
Rodnik	0,07	Výsledky jsou shodné

Lordovým testem byla vypočítána shodnost výsledků mezi V a Keř z Holovous. Shoda byla pozorována u všech odrůd kromě odrůdy Karát a Rolonda. Nejvyšší hodnota Lordova testu shodnosti byla $u = 2,26$, což představuje rozdíl 31 %.

Tabulka č. 31: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové u pěstitelského tvaru V z Holovous a pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	2,41	Výsledky nejsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,46	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	1,25	Výsledky jsou shodné
Karát	1,67	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	1,91	Výsledky nejsou shodné
Alan	0,10	Výsledky jsou shodné

Shodnost výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové u tvaru V od pěstitele Vondráčka a z Holovous byla pozorována u odrůd Invicta, Hinnonmaki Rot a Alan. U ostatních odrůd byl prokázán mezi výsledky statisticky významný rozdíl, který byl největší u odrůdy Rixanta a činil 34 %.

Tabulka č. 32: Hodnoty Lordova testu (u) pro porovnání shodnosti výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové u pěstitelského tvaru Keř z Holovous a pěstitele Vondráčka a porovnání výsledků s tabelovanou hodnotou ($u_{krit.} = 1,304$)

Odrůda	u	Hypotéza
Zelenoplodá		
Rixanta	1,24	Výsledky jsou shodné
Žlutoplodá		
Invicta	0,53	Výsledky jsou shodné
Červenoplodá		
Hinnonmaki Rot	0,66	Výsledky jsou shodné
Karát	2,22	Výsledky nejsou shodné
Krasnoslawjankij	2,75	Výsledky nejsou shodné

Porovnáním shodnosti výsledků celkového obsahu kyseliny askorbové u tvaru Keř z Holovous a od Vondráčka byla shoda pozorována u odrůd Rixanta, Invicta a Hinnonmaki Rot. Nejvyšší rozdíl v obsahu vitamínu C u tvaru Keř z obou stanovišť byl u odrůdy Krasnoslawjankij a činil 16 %.

5.4 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Celková antioxidační aktivita jednotlivých odrůd angreštu byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 3.8.3. Každý vzorek, který byl připraven dle kapitoly 3.8.2, byl proměřen celkem třikrát na spektrofotometru při 517 nm.

Pro výpočet antioxidační aktivity všech vzorků byla vybrána průměrná hodnota absorbance ze tří měření, v čase 80 s. Antioxidační aktivita byla vypočítána ze vztahu (6) uvedeného v kapitole 3.8.4 a je vyjádřena v [%]. V *Tabulce č. 33* můžeme vidět příklad naměřených hodnot absorbance u odrůdy Rixanta, kurzívou jsou označeny hodnoty absorbance pro výpočet antioxidační aktivity.

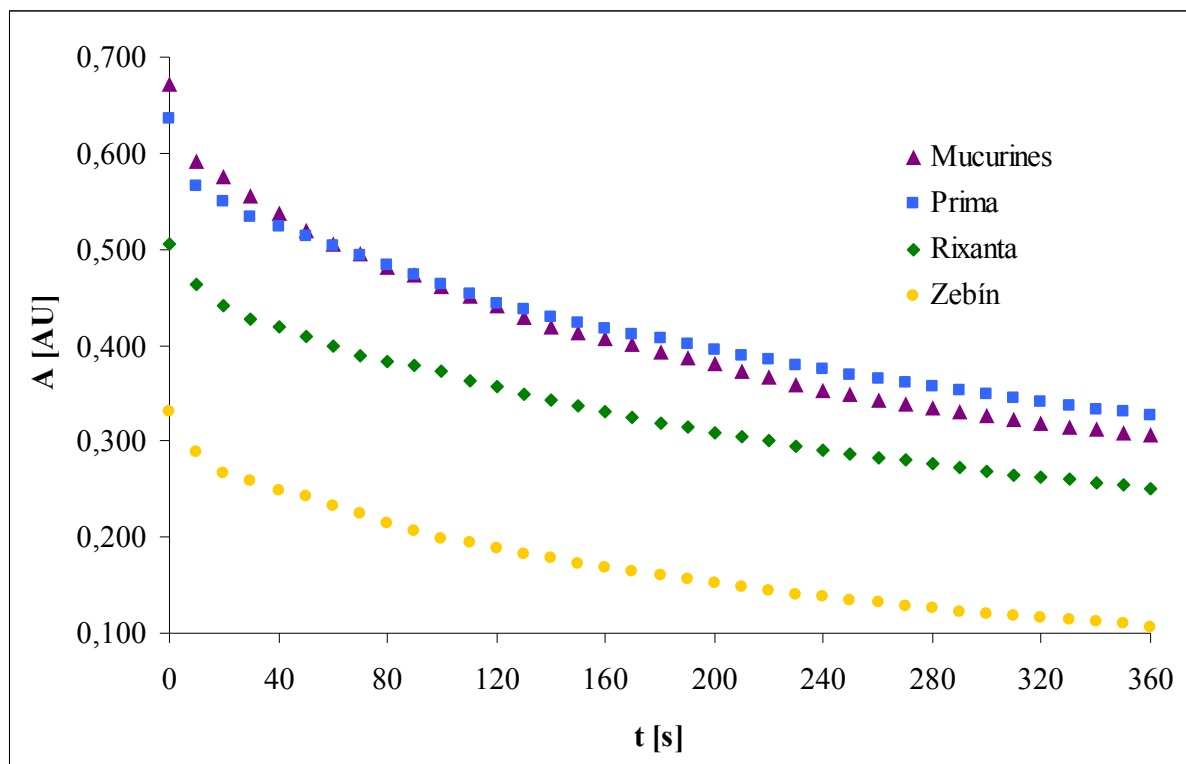
Antioxidační aktivitu můžeme charakterizovat jako schopnost daného vzorku eliminovat určité množství radikálu DPPH. Nejvyšší zhášecí aktivita 72,215 % byla naměřena u zelenoplodé odrůdy Zebín, což znamená, že tato odrůda v čase 80 s eliminovala 72,215 % přítomných molekul radikálu DPPH.

Tabulka č. 33: Naměřené hodnoty absorbancí u zelenoplodé odrůdy Rixanta

Čas [s]	A ₁	A ₂	A ₃	Čas [s]	A ₁	A ₂	A ₃	Čas [s]	A ₁	A ₂	A ₃
0	0,505	0,504	0,506	130	0,346	0,351	0,348	260	0,282	0,284	0,282
10	0,465	0,462	0,464	140	0,338	0,346	0,342	270	0,279	0,28	0,28
20	0,438	0,445	0,440	150	0,334	0,338	0,336	280	0,275	0,277	0,276
30	0,421	0,433	0,426	160	0,330	0,332	0,331	290	0,271	0,273	0,273
40	0,415	0,425	0,420	170	0,322	0,326	0,324	300	0,268	0,27	0,269
50	0,406	0,411	0,408	180	0,318	0,321	0,320	310	0,265	0,266	0,265
60	0,398	0,398	0,398	190	0,313	0,315	0,314	320	0,261	0,263	0,262
70	0,390	0,388	0,389	200	0,308	0,310	0,309	330	0,258	0,261	0,260
80	<i>0,385</i>	<i>0,381</i>	<i>0,383</i>	210	0,303	0,306	0,305	340	0,255	0,257	0,256
90	0,380	0,376	0,378	220	0,299	0,301	0,300	350	0,252	0,255	0,254
100	0,375	0,372	0,374	230	0,294	0,296	0,296	360	0,249	0,252	0,252
110	0,364	0,362	0,363	240	0,290	0,292	0,291				
120	0,356	0,357	0,356	250	0,286	0,287	0,286				

5.4.1 Zelenoplodé odrůdy

Z naměřených hodnot absorbancí byla sestrojena závislost poklesu absorbance na čase. K zajištění optimálního časového průběhu dané reakce muselo být zvoleno vhodné ředění vzorku, aby nedocházelo k příliš rychlé reakci antioxidantů s volným radikálem DPPH. U těchto odrůd bylo nutno vzorky ředit třikrát. V následujícím *Grafu č. 12*: byl pozorován tento pokles u zelenoplodých odrůd.



Graf č. 12: Závislost poklesu absorbance na čase u zelenoplodých odrůd

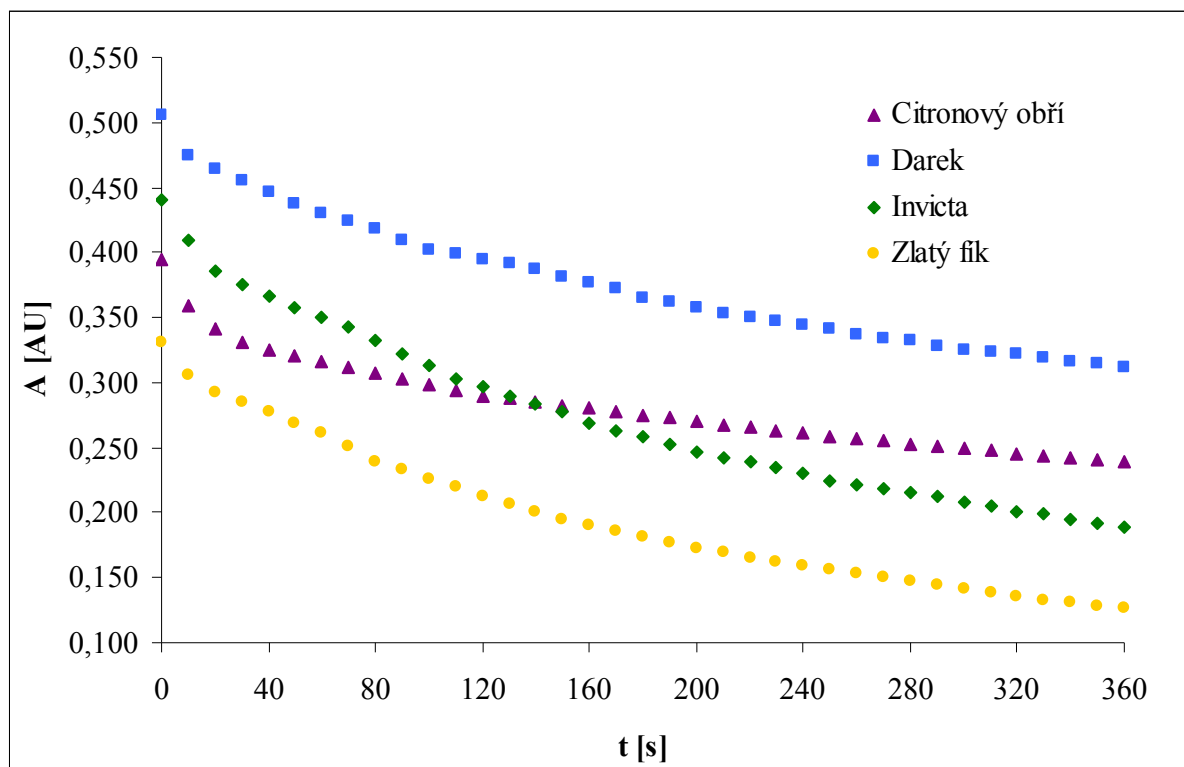
Antioxidační aktivita u zelenoplodých odrůd angreštu se pohybuje v rozmezí od 37,72 % do 72,22 %. Nejvyšší antioxidační aktivitu pozorujeme u odrůdy Zebín, která také obsahuje největší množství kyseliny askorbové. Nejnižší aktivitu naopak vykazují odrůdy Mucurines a Prima.

Tabulka č. 34: Výsledné hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých zelenoplodých odrůd

Zelenoplodé odrůdy	Průměrná absorbance A (v čase 80 s)	Antioxidační aktivita [%]
Mucurines	0,482	37,85 ± 0,01
Prima	0,483	37,72 ± 0,02
Rixanta	0,383	50,58 ± 0,01
Zebín	0,215	72,22 ± 0,01

5.4.2 Žlutoplodé odrůdy

U žlutoplodých odrůd byla rovněž sestrojena závislost poklesu absorbance na čase, což lze vidět v *Grafu č. 13*. Pro optimální průběh reakce bylo zde zvoleno stejné ředění (třikrát), jako u zelenoplodých odrůd.



Graf č. 13: Závislost poklesu absorbance na čase u žlutoplodých odrůd

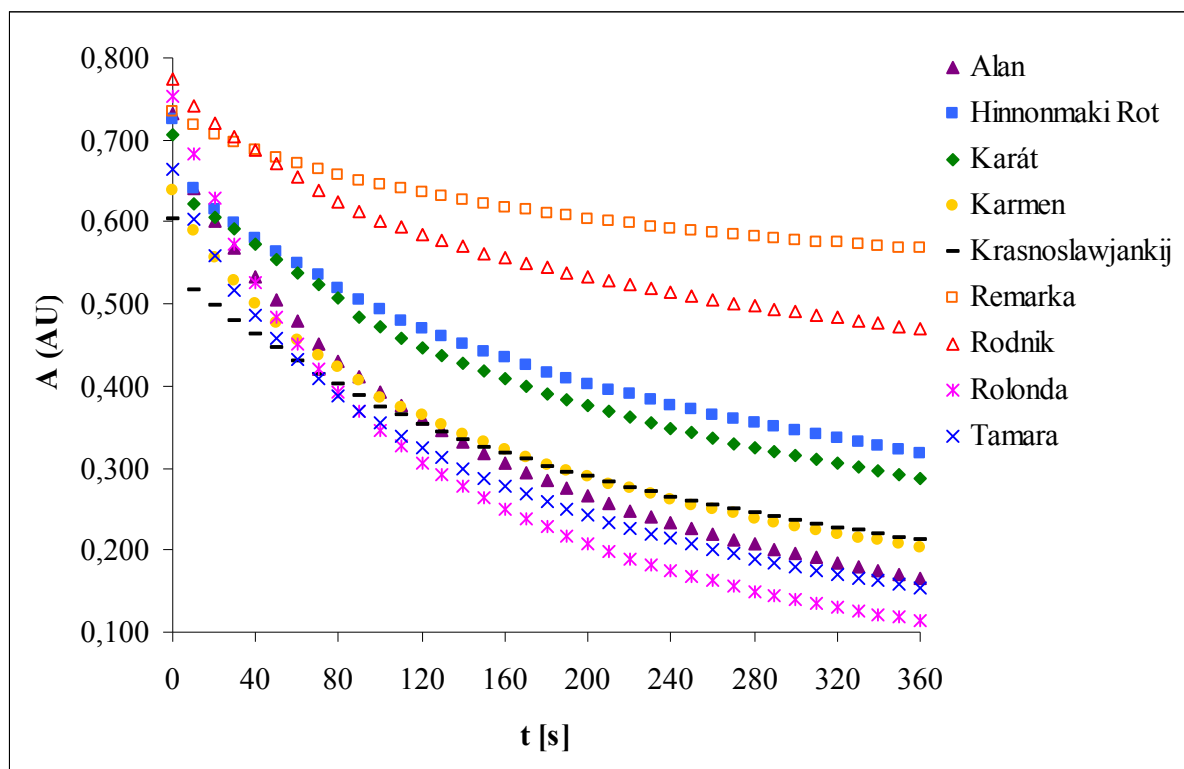
Zjištěné hodnoty antioxidační aktivity u žlutoplodých odrůd se pohybují v rozmezí od 46,02 % do 69,08 %. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazuje odrůda Zlatý fík, která rovněž obsahuje i velké množství kyseliny askorbové. Nejnižší schopnost eliminovat přítomné molekuly DPPH má odrůda Darek.

Tabulka č. 35: Výsledné hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých žlutoplodých odrůd

Žlutoplodé odrůdy	Průměrná absorbance A (v čase 80 s)	Antioxidační aktivita [%]
Citronový obří	0,307	60,43 ± 0,01
Darek	0,418	46,02 ± 0,04
Invicta	0,332	57,12 ± 0,02
Zlatý fík	0,240	69,08 ± 0,02

5.4.3 Červenoplodé odrůdy

Závislost poklesu absorbance na čase u červenoplodých odrůd je uvedena v *Grafu č. 14*. U těchto odrůd bylo zvoleno ředění pětkrát, jelikož u trojnásobného ředění docházelo k příliš rychlé reakci antioxidantu s volným radikálem DPPH.



Graf č. 14: Závislost poklesu absorbance na čase u červenoplodých odrůd

Naměřené hodnoty antioxidační aktivity u červenoplodých odrůd se pohybují v rozmezí od 27,07 % naměřené u odrůdy Remarka do 57,21 % naměřené u odrůdy Tamara.

Tabulka č. 36: Výsledné hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých červenoplodých odrůd

Červenoplodé odrůdy	Průměrná absorbance A (v čase 80 s)	Antioxidační aktivita [%]
Alan V	0,430	50,58 ± 0,02
Hinnonmaki Rot	0,518	43,01 ± 0,02
Karát V	0,507	44,26 ± 0,02
Karmen V	0,422	52,55 ± 0,01
Krasnoslawjankij	0,401	54,91 ± 0,01
Remarka	0,658	27,07 ± 0,02
Rodnik	0,624	31,32 ± 0,01
Rolonda	0,393	56,73 ± 0,01
Tamara	0,389	57,21 ± 0,02

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit vybrané chemické parametry v moderních odrůdách angreštu (*Grossularia uva-crispa*). Teoretická část byla zaměřena na botanickou charakteristiku rostliny, stručný popis vybraných odrůd a potravinářské využití plodů. Následně byl zpracován přehled biologicky účinných látek přítomných v plodech angreštu. Velká část byla zaměřena na charakteristiku anthokyanů, fenolických látek, vitamínu C, antioxidantů a možnosti jejich stanovení.

Cílem experimentální části bylo stanovit a porovnat obsah jednotlivých chemických parametrů celkem v 17 vybraných odrůdách v rámci projektu Ministerstva zemědělství číslo QI111A141 s názvem: Výzkum nových technologií v pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na kvalitu a využití plodů. Odrůdy pocházely ze dvou míst od pěstitele Vondráčka a z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích s.r.o (dále jen Holovousy) a byly dodány ve dvou pěstitelských tvarech: V a Keř. Úkolem bylo zjistit, zda existují rozdíly v obsahu výše zmíněných látek v závislosti na různém pěstitelském stanovišti a odlišném tvaru keře.

Celkový obsah monomerního anthokyanového pigmentu byl stanoven pH diferenciální metodou a byl přepočítán na kyanidin 3-glukosid, který je v plodech angreštu nejvíce zastoupeným anthokyanem. Obsah anthokyanů v zelenoplodých odrůdách angreštu je velmi malý, vzhledem k tomu, že anthokyany dávají rostlinám modré, červené a fialové zbarvení. U žlutoplodých odrůd je obsah monomerního pigmentu nepatrně vyšší. Ze statistického zhodnocení výsledků vyplývá, že by tvar keře neměl mít vliv na obsah anthokyanů. Naopak různé pěstitelské stanoviště ovlivňuje obsah pouze u tvaru Keř. Vyšší obsah monomerního pigmentu byl pozorován u odrůd pocházejících z Holovous. Tento rozdíl mohl být způsoben odlišným stupněm zralosti, plody od pěstitele Vondráčka byly sesbírány dříve a nemusely tak být dostatečně zralé. Červenoplodé odrůdy obsahují dle předpokladů podstatně vyšší množství anthokyanů. Ze statistického zhodnocení výsledků obsahů monomerního pigmentu vyplývá, že pěstitelský tvar ovlivňuje jejich obsah u některých červených odrůd. U většiny vzorků je pozorován vyšší obsah u tvaru Keř. Na obsah anthokyanů má také výrazný vliv pěstitelské stanoviště. Množství monomerního anthokyanového pigmentu v plodech angreštu závisí na odrůdě, ekologických podmínkách, stupni agrotechnických zásahů a především na teplotě a slunečním záření. Pokud jsou plody méně osvětlené, dochází ke snížení tvorby anthokyanů. Důležitým faktorem je také teplota v průběhu dozrávání, která má vliv na intenzitu zbarvení plodů.

Obsah celkových polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky za použití Folin-Ciocalteuova činidla. Obsah v jednotlivých odrůdách se pohybuje v širokém rozmezí od 37,54 do 246,32 mg · 100 g⁻¹ plodů, nejvyšší obsah však byl nalezen u červených angreštů. Téměř u všech plodů byly zjištěny rozdíly v závislosti na pěstitelském tvaru a pěstitelském stanovišti. U zelených a žlutých odrůd byl vyšší obsah polyfenolů u tvaru V, u červených je tomu naopak a nejvíc polyfenolů obsahuje převážně tvar Keř. Ve většině případů byl pozorován vyšší obsah celkových polyfenolů u odrůd pocházejících z Holovous. Obsah fenolických látek stejně jako anthokyanů ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří např. složení a chemické vlastnosti půdy, charakter okolní krajiny, oslunění, teplotní a povětrnostní

podmínky. Různé podmínky způsobují změny, zejména ve kvantitativním složení fenolických látek.

U odrůd s nejvyšším obsahem monomerního anthokyanového pigmentu byl pozorován i nejvyšší obsah polyfenolů, což se dalo předpokládat vzhledem k tomu, že anthokyany patří do skupiny fenolických látek. Mezi odrůdy s vysokým obsahem obou analyzovaných látek (anthokyany a polyfenoly) patří zelenoplodá odrůda Prima a Rixanta z Holovous, žlutoplodá odrůda Invicta – V z Holovous a červenoplodé odrůdy Karát – V z Holovous, Karmen – V z Holovous a Alan z Holovous.

Pro stanovení celkového obsahu vitamínu C byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází. Obsah vitamínu C v angreštu se pohybuje v rozmezí 13,1 – 30,9 mg · 100 g⁻¹ plodů. U všech odrůd lze pozorovat vyšší množství kyseliny askorbové u pěstitelského tvaru V. U zelených a žlutých odrůd je rozdíl v obsahu vitamínu C mezi tvarem V a Keř jen malý, u červenoplodých odrůd je naopak tento rozdíl velký. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že u tvaru keře V jsou ponechány jen dvě základní větve a plody zde mají více prostoru pro růst a více slunečního světla oproti pěstitelskému tvaru Keř. Rozdíly v obsahu kyseliny askorbové u odrůd pocházejících z obou stanovišť jsou v některých případech statisticky významné a u jiných ne. Množství kyseliny askorbové v jednotlivých odrůdách závisí např. na slunečním osvětlení, teplotě, množství vody, výživě atd. Vysoký obsah vitamínu C obsahují zelenoplodá odrůda Zebín, žlutoplodá odrůda Zlatý fík a červenoplodé odrůdy Rolonda – V z Holovous a Krasnoslawjankij od pěstitele Vondráčka.

Anthokyany, polyfenoly a vitamin C patří mezi významné antioxidanty a proto byla také stanovena celková antioxidační aktivita. Stanovení spočívalo v eliminaci volného radikálu DPPH pomocí antioxidantů obsažených v plodech angreštu. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u zelenoplodé odrůdy Zebín (72,22 %) a u žlutoplodé odrůdy Zlatý fík (69,08 %), které rovněž obsahují i nejvyšší množství vitamínu C. U červenoplodých odrůd vykazovala nejvyšší aktivitu odrůda Tamara (57,21 %).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] POLÍVKA, F. *Názorná květena zemí koruny české, svazek 2*. Olomouc [online] 1904 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <<http://botanika.wendys.cz/kvetena/kvetena.php?dil=2&page=566>>.
- [2] OBERBEIL, K., LENZ, CH. *Ovoce a zelenina jako lék: strava, která léčí*. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, 2001, 294 s. ISBN 80-86144-90-9.
- [3] KYNES, S. *Šepoty lesa: stromy a magie*. Hodkovičky [Praha]: Pragma, 2009, 262 s. ISBN 978-80-7349-179-6.
- [4] FLOWERDEW, B. *Ovoce: velká kniha plodů*. 1. vyd. Praha: Volvox Globator, 1997, 256 s. ISBN 80-7207-052-5
- [5] RICHTER, M., KOPŘIVA, J. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce*. 1. vyd. Lanškrouť: TG tisk. 2004. 85 s. ISBN 80-903487-6-9.
- [6] *BioLib.cz* [online]. 2008 [cit. 2014-04-10]. Profil taxonu. Dostupné z: <<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id628035/>>.
- [7] MOHELSKÝ, T. *Zástupce drobného ovoce - angrešt a jeho nutriční charakteristiky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 54 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [8] DUŠKOVÁ, L., KOPŘIVA, J. *Pěstujeme rybíz, angrešt a jostu*. 1. vyd. Praha: Grada. 2002. 112 s. ISBN 80-247-0223-1.
- [9] ŠAPIRO, D.K. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988, 227 s.
- [10] BULKOVÁ, V. *Rostlinné potraviny*. 1 vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011, 162 s. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [11] HARANT, M., ZACHA, V. *Pěstujeme bobuloviny*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 1974. 258 s.
- [12] BLATTNÝ, C., et al. *Rybízy, angrešty, maliníky a ostružiníky*. 1. vyd. Praha: Academia. 1971. 576 s.
- [13] PHILLIPS, M. *The holistic orchard: tree fruits and berries the biological way*. White River Junction, Vt.: Chelsea Green Pub., 2011, p. cm. ISBN 978-160-3584-074.

- [14] BISCHOF, H., SUS, J. *Řez ovocných stromů a keřů*. 1. vyd. Praha: Ottovo nakladatelství, divize Cesty, 2003, 183 s. ISBN 80-7181-821-6.
- [15] HESSAYON, D. *Ovoce*. 1. vyd. Praha: Beta-Dobrovský & Ševčík, 1999, 128 s. ISBN 80-86278-29-8.
- [16] SUS, J., NEČAS, T. *Řez ovocných dřevin*. Praha: Grada, 2011, 144 s. ISBN 978-80-247-2505-5.
- [17] STANGL, M. *Řez dřevin v zahradě*. 5. vyd. Čestlice: Rebo, 2013, 94 s. ISBN 978-80-255-0731-5.
- [18] LUŽA, J a KOL. *Malá pomologie V – rybíz, angrešt, maliny, ostružiny a jahody*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 1967. 385 s.
- [19] *Houbaření* [online]. 2012 [cit. 2014-05-10]. Dostupné z: <<http://www.houbareni.cz/disc.php?start=753>>.
- [20] PIEBER, K., MODL, P. *Tvarování ovocných dřevin: kordony, palmety, špalíry*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 2013, 158 s. ISBN 978-80-242-4019-0.
- [21] HRIČOVSKÝ, I. *Rybíz, angrešt na zahrádce*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 1990. 52 s. ISBN 80-209-0097-7.
- [22] *Hruškovy ovocné a okrasné školky* [online]. 2013 [cit. 2014-04-10]. Angrešt Zlatý fik. Dostupné z: <<http://www.hruska-skolky.cz/prodejna-produkt/angrest-zlaty-fik>>.
- [23] *Zahrady Řiháček* [online]. [cit. 2014-04-13]. Angrešt. Dostupné z: <<http://www.zahrady-rihacek.cz/category/ovocne-stromy>>.
- [24] KAZDA, J. *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*. 3. vyd. Praha: Zemědělec, 2003, 152 s. ISBN 80-86726-03-7.
- [25] ROD, J. *Atlas chorob a škůdců ovoce, zeleniny a okrasných rostlin*. 4., dopl. a přeprac. vyd. Líbeznice: Víkend, 2012, 94 s. ISBN 978-80-7433-051-3.
- [26] ŠEDIVÝ, J. *Ochrana rostlin na zahradě od jara do zimy: [ochrana zeleniny, brambor, ovoce, okrasných rostlin : choroby a škůdci : chemické a biologické prostředky]*. 1. vyd. Praha: Grada, 1997, 124 s., [4] s. obrazových příloh. ISBN 80-7169-523-8.

- [27] *Ucivo.webnode.cz* [online]. 2008 [cit. 2014-04-13]. Houby vřeckaté. Dostupné z: <<http://ucivo.webnode.cz/poznavacky-hub/houby-vreckate/>>.
- [28] *Agromanuál.cz* [online]. 2003 [cit. 2014-04-10]. Mšice srstková. Dostupné z: <<http://www.agromanual.cz/cz/atlas/skudci/skudce/msice-srstkova.html>>.
- [29] *Zahradnictví JIKL* [online]. 2013 [cit. 2014-04-10]. Rybíz a Angrešt. Dostupné z: <<http://www.jikl.cz/440-rybiz-a-angrest>>.
- [30] *Metodický portál* [online]. 2010 [cit. 2014-04-13]. Srstka angrešt. Dostupné z: <http://wiki.rvp.cz/Kabinet%2FObrázky%2FP%C5%99%C3%ADroda%2FKe%C5%99e%2FSrstka_angre%C5%A1t>.
- [31] *Kaliště* [online]. 2010 [cit. 2014-04-13]. Jemná krása květů. Dostupné z: <<http://zahrada-kaliste.blogspot.cz/2010/05/jemnai-krasa-kvetu.html>>.
- [32] *Móda.cz* [online]. 2011 [cit. 2014-04-13]. Angrešt podporuje zažívání i tvorbu zdravé pokožky. Dostupné z: <http://www.moda.cz/Kategorie/Zdrave_mlsani/20110628_Angrest_podporuje_zazivan_i_i_tvorbu_zdrave_pokozky.html>.
- [33] UHROVÁ, H. *Domácí výroba slivovice a ostatních destilátů, ovocných šťáv, sirupů a vín*. Líbeznice: Víkend, 2009, 110 s. ISBN 978-80-7433-014-8.
- [34] BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová správa ovoce [online]. 2011 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/file/134857/OVOCE_10_2011.pdf>.
- [35] GOUGH, R.E., POLING, E. *Small fruits in the home garden: tree fruits and berries the biological way*. 2nd ed. New York: Food Products Press, c1996, 272 p. ISBN 15-602-2057-0.
- [36] BALCH, P.A. *Prescription for dietary wellness: tree fruits and berries the biological way*. 2nd ed. New York: Avery, c2003, xi, 307 p. ISBN 15-833-3147-6.
- [37] ŽÁČEK, Z., ŽÁČEK, A. *Potravinářské tabulky*. 1.vyd. Praha: SPN, 1994, 484 s. ISBN 80-04-24457-2.
- [38] Online potravinová databáze [online]. 2012, [cit. 2014-04-15]. Dostupné z: <<http://www.pbd-online.sk/>>.
- [39] OPLETAL, L. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 378 s. ISBN 978-80-246-1884-5.

- [40] VÁVROVÁ, J. *Vitaminy a stopové prvky 2007*. 1. vyd. Pardubice: SEKK, 2007, 155 s. ISBN 978-80-254-1171-1.)
- [41] KOPEC, K. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998, 72 s. ISBN 80-86153-64-9.)
- [42] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [43] PAPAS, A.M. *Vitamin E: zázračný antioxidant při prevenci a léčbě srdečních chorob, rakoviny a stárnutí*. Praha: PRAGMA, c2001, 380 s. ISBN 80-7205-773-1.
- [44] MURRAY, R.K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., 2. čes. vyd., v H&H 1. Praha: H & H, 1998, ix, 872 s. ISBN 80-85787-38-5.
- [45] MANDŽUKOVÁ, J. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek: praktický domácí rádce*. 1. vyd. Benešov:Start, 2005, 267 s. ISBN 80-86231-36-4.
- [46] JORDÁN, V., HEMZALOVÁ, M. *Antioxidanty : zázračné zbraně : vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. 1. vyd. Brno: Jota, 2001, 153 s. ISBN 80-7217-156-9.
- [47] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [48] KONG, J. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003, vol. 64, issue 5, pp. 923-933. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00438-2. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942203004382>>.
- [49] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996, 186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [50] MÍKA, V. *Fenolické látky v lučních rostlinách*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2001, 116 s., 56 s. ISBN 80-86555-07-0.
- [51] CASTAÑEDA-OVANDO, A., at al. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, issue 4, pp. 859-871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608010674>>.

- [52] BALÍK, J. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, 108 s. ISBN 978-80-7375-412-9.
- [53] JORDHEIM, M., MÅGE, F., at al. Anthocyanins in Berries of Ribes Including Gooseberry Cultivars with a High Content of Acylated Pigments: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, issue 14, pp. 5529-5535. DOI: 10.1021/jf0709000. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0709000>>.
- [54] HONG, V., WROLSTAD, R.E., at al. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990, vol. 38, issue 3, pp. 708-715. DOI: 10.1021/jf00093a026. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00093a026>>.
- [55] DENEV, P., CIZ, M., AMBROZOVA, G., LOJEK, A., YANAKIEVA, I. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties: A review. *Food Chemistry*. 2010, vol. 123, issue 4, pp. 1055-1061. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.061. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610006357>>.
- [56] LEE, J., RENNAKER, CH., WROLSTAD, R.E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 2008, vol. 110, issue 3, pp. 782-786. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.010. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460800304X>>.
- [57] WELCH, C., et al. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization: A review. *Current Analytical Chemistry*. 2008-04-01, vol. 4, issue 2, pp. 75-101. DOI: 10.2174/157341108784587795. Dostupné z: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>>.
- [58] GIUSTI, M.M, WROLSTAD, R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. DOI: 10.1002/0471142913.faf0102s00. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/0471142913.faf0102s00>>.
- [59] WROLSTAD, R.E., DURST, R.W., LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science*. 2005, vol. 16, issue 9, pp. 423-428. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.03.019. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405001548>>.

- [60] DURST, R.W., WROLSTAD, R.E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 2005, vol. 88, issue 5. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385975>>.
- [61] MALEJKO, J., et al. Determination of the total polyphenolic content in *Cirsium palustre* (L.) leaves extracts with manganese(IV) chemiluminescence detection. *Food Chemistry*. 2014, vol. 152. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.138. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613018281>>.
- [62] BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998, vol. 56, issue 11, pp. 317-333. ISSN: 0029-6643. Dostupné z: <<http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/212310380?accountid=1711>>.
- [63] IGNAT, I., VOLF, I., POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, vol. 126, issue 4, pp. 1821-1835. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016353>>.
- [64] MATTILA, P., HELLSTRÖM, J., TÖRRÖNEN, R. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, issue 19, pp. 7193-7199. DOI: 10.1021/jf0615247. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0615247>>.
- [65] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K. *Biosynthesis of food components*. 1st ed. Tábor: OSSIS, 2008, xii, 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [66] STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, issue 3, pp. 607-616. DOI: 10.1021/jf052334j. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf052334j>>.
- [67] BLAINSKI, A., et al. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 2013, vol. 18, issue 6, pp. 6852-6865. DOI: 10.3390/molecules18066852. Dostupné z: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6852/>>.

- [68] MEDINA, M.B., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011-03-09, vol. 59, issue 5, pp. 1565-1571. DOI: 10.1021/jf103711c. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf103711c>>.
- [69] STRATIL, P., KUBÁŇ, V., FOJTOVA, J. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008-04-26, vol. 26, issue, pp. 242-253.
- [70] MARCANÍKOVÁ, A., BEŇOVÁ, B. Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy*. 2010, vol. 104, s. 27-30.
- [71] HÁJKOVÁ, J., PERGLEROVÁ, M. *Léčivá moc vitaminů, bylin a minerálních látek*. 1. vyd. Praha: Reader's Digest Výběr, 2001, 416 s. ISBN 80-86196-24-0.
- [72] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 2. vyd. upr. Tábor: OSSIS, 2002, 320 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [73] *PEDAGOGICKÁ FAKULTA Masarykovy univerzity* [online]. 2009 [cit. 2014-04-20]. Struktura a názvosloví. Dostupné z: <<http://www.ped.muni.cz/WCHEM/comenius2000/vitaminc/struktura.htm>>.
- [74] FARKOVÁ, M. *Instrumentální analytická chemie - praktikum*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 167 s. ISBN 978-80-210-5534-6.
- [75] ARYA, S., MAHAJAN, M., JAIN, P. Photometric Methods for the Determination of Vitamin C. *Analytical science*. 1998, vol. 14, pp. 889-895.
- [76] ARYA, S., MAHAJAN, M., JAIN, P. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 417, issue 1, pp. 1-14. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)00909-0. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000009090>>.
- [77] KHAN, M.M. et al. A Simple UV-spectrophotometric Method for the Determination of Vitamin C Content in Various Fruits and Vegetables at Sylhet Area in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences*. 2006-2-1, vol. 6, issue 2, pp. 388-392. DOI: 10.3923/jbs.2006.388.392. Dostupné z: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2006.388.392>>.

- [78] NOVÁKOVÁ, L., et al. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, vol. 27, issue 10, pp. 942-958. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.006. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608001805>>.
- [79] CHIANG, CH. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, vol. 51, issue 2, pp. 417-422. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.11.014. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812004628>>.
- [80] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, vol. 98, s. 174-179.
- [81] CONTESSA, C., et al. Total antioxidant capacity and total phenolic and anthocyanin contents in fruit species grown in Northwest Italy. *Scientia Horticulturae*. 2013, vol. 160, issue 3, pp. 351-357. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.06.019. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423813003051>>.
- [82] MUSA, K.H., et al. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2013, vol. 141, issue 4, pp. 4102-4106. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.112. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613008893>>.
- [83] CHEN, Z., et al. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*. 2013, vol. 138, issue 1, pp. 414-420. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612016020>>.
- [84] DAWIDOWICZ, A.L., et al. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*. 2012, vol. 131, issue 3, pp. 1037-1043. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.067. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611013446>>.
- [85] DOUŠA, M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002, 129 s. ISBN 80-86548-09-0.
- [86] NOVÁKOVÁ, L. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3
- [87] *HPLC.cz* [online]. 2010 [cit. 2014-04-13] Postkolonová derivatizace v HPLC. Dostupné z: <<http://www.hplc.cz/Der/pcrs.htm>>.

- [88] HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. *Analytická chemie: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty vysokých škol chemicko-technologických skupin studijních oborů 27-Technická chemie silikátů, 28-Technická chemie ostatní, 29-Potravinářství*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1987, 663 s.
- [89] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [90] LEHOTAY, J. *Separáčné metódy v analytickej chémii*. 1. vyd. Bratislava: Nakladateľstvo STU, 2009, 233 s. ISBN 978-80-227-3036-5.
- [91] JANČÁŘOVÁ, I., JANČÁŘ, L. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 80-7157-647-6.
- [92] MILATA, V., SEGĽA, P. *Spektrálne metódy v chémii*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2004, 327 s. ISBN 80-227-2049-6.
- [93] MAYACHIEW, P., DEVAHASTIN, S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 2008, vol. 41, issue 7, pp. 1153-1159. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.07.019. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643807002745>>.
- [94] WU, X., GU, L., et al. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, vol. 52, issue 26, pp. 7846-7856. DOI: 10.1021/jf0486850. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0486850>>.
- [95] PANTELIDIS, G., VASILAKAKIS, M., MANGANARIS, G., DIAMANTIDIS, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*. 2007, vol. 102, issue 3, pp. 777-783. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.06.021. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606004833>>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	(antioxidant activity) – antioxidační aktivita
AAPH	2,2-azobis-(2-amidino-propan) dihydrochlorid
ABTS	2,2-azinobis (3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazoline-6-sulfonová kyselina)
APCI	(atmospheric pressure chemici ionization) – chemická ionizace za atmosférického tlaku
CE	(capillary electrophoresis) – kapilární elektroforéza
CUPRAC	(cupric reducing antioxidant capacity) – metoda založena na redukci Cu^{2+} komplexu
CZE	(capillary zone electrophoresis) – kapilární zónová elektroforéza
DAD	(diode array detector) – detektor s diodovým polem
DCIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DHA	(dehydroascorbic acid) – kyselina dehydroaskorbová
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
ESI	(electrospray ionization) – ionizace elektrosprejem
FAB	(fast atom bombardment) – ionizace nárazem urychlených atomů
FAD	flavinadenindinukleotid
FCH	(faculty of chemistry) – fakulta chemická
FMN	flavinmononukleotid
FRAP	(ferric reducing antioxidant power) – metoda založena na redukci Fe^{3+} komplexu
GC	(gas chromatography) – plynová chromatografie
HIC	(hydrophobic interactin chromatography) – chromatografie s hydrofobní interakcí
HILIC	(hydrophilic interaction liquid chromatography) – kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	(high-performance liquid chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LLC	(liquid-liquid chromatography) – kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	(liquid-solid chromatography) – kapalinová adsorpční chromatografie
MALDI	(matrix-assisted laser desorption/ionization) – ionizace laserem za přítomnosti matrice
MEKC	(micellar electrokinetic chromatography) – micelární elektrokinetická chromatografie
MMT	[3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-difenyltetrazolium bromid]
MS	(mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie
ODS	oktadecylsilikagel
ORAC	(oxygen radiál absorption capacity) – metoda hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

PEEK	polyetheretherketon
PC	(paper chromatography) – papírová chromatografie
PMS	5-methylphenazinium methosulphate
RP-HPLC	(reversed-phase HPLC) – chromatografie s obrácenými fázemi
SPE	(solid phase extraction) – extrakce na tuhé fázi
TEAC	(trolox equivalent antioxidant capacity) – metoda používající ABTS
TLC	(thin layer chromatography) – chromatografie na tenké vrstvě
UV	(ultraviolet radiation) – ultrafialové záření
VIS	(visible radiation) – viditelné záření
VUT	(University of technology) – Vysoké učení technické

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Hodnoty koncentrace monomerního pigmentu přepočtené na 100 g čerstvých plodů stanovené pH diferenciální metodou

Příloha 2: Obsah celkových polyfenolů stanovených v jednotlivých odrůdách angreštu

Příloha 3: Chromatogram pro odrůdu Zlatý fík

Příloha 4: Naměřené hodnoty pro stanovení koncentrace kyseliny askorbové

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Hodnoty koncentrace monomerního pigmentu přepočtené na 100 g čerstvých plodů stanovené pH diferenciální metodou

Zelenoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g ⁻¹]				IS
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Rixanta V – Vondráček	0,18	0,15	0,19	0,17	0,02
Rixanta Keř – Vondráček	0,03	0,04	0,01	0,03	0,01
Rixanta V – Holovousy	0,14	0,13	0,16	0,14	0,02
Rixanta Keř – Holovousy	0,15	0,13	0,16	0,14	0,01
Mucurines V – Holovousy	0,10	0,12	0,08	0,10	0,02
Mucurines K – Holovousy	0,14	0,15	0,12	0,14	0,01
Prima V – Vondráček	0,19	0,23	0,17	0,20	0,03
Zebín V – Vondráček	0,04	0,03	0,06	0,04	0,01

Žlutoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g ⁻¹]				IS
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Invicta V – Vondráček	0,14	0,12	0,20	0,16	0,04
Invicta Keř – Vondráček	0,08	0,07	0,09	0,08	0,01
Invicta V – Holovousy	0,31	0,26	0,35	0,31	0,04
Invicta Keř – Holovousy	0,20	0,23	0,20	0,21	0,01
Citronový obří V – Vondráček	0,29	0,23	0,31	0,28	0,04
Citronový obří Keř - Holovousy	0,20	0,19	0,21	0,20	0,01
Darek V – Vondráček	0,09	0,07	0,12	0,09	0,03
Zlatý fík V – Vondráček	0,03	0,04	0,02	0,03	0,01

Červenoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g ⁻¹]				IS
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Hinnonmaki Rot V – Vondráček	2,53	2,03	3,27	2,61	0,57
Hinnonmaki Rot Keř – Vondráček	4,89	4,26	5,35	4,84	0,50
Hinnonmaki Rot V – Holovousy	1,00	1,32	0,86	1,06	0,21
Hinnonmaki Rot Keř – Holovousy	3,81	3,23	4,17	3,74	0,43
Karát V – Vondráček	22,15	19,13	22,36	21,22	1,67
Karát Keř – Vondráček	3,41	1,42	4,74	3,19	1,55
Karát V – Holovousy	0,89	2,33	0,88	1,36	0,77
Karát Keř – Holovousy	2,26	2,40	0,45	1,70	1,00
Krasnoslawjankij V – Vondráček					
Krasnoslawjankij Keř – Vondráček	1,67 0,66	1,49 0,52	1,82 0,82	1,66 0,67	0,15 0,14
Krasnoslawjankij V – Holovousy	3,67	4,16	3,03	3,62	0,52
Krasnoslawjankij Keř – Holovousy	8,51	7,65	9,35	8,50	0,79
Remarka V – Vondráček	2,58	3,15	2,05	2,59	0,51
Remarka Keř – Vondráček	1,53	0,80	2,13	1,49	0,62
Remarka V – Holovousy	1,19	0,76	1,57	1,17	0,38
Remarka Keř – Holovousy	3,51	2,13	4,46	3,37	1,08
Alan V – Holovousy	13,62	12,05	15,03	13,57	1,38
Alan K – Holovousy	22,07	24,97	20,95	22,66	1,92
Alan V – Vondráček	18,54	17,89	20,77	19,07	1,39
Karmen V – Vondráček	2,58	2,06	2,86	2,50	0,38
Karmen Keř – Vondráček	4,82	3,46	5,27	4,52	0,87
Karmen V – Holovousy	22,67	21,01	24,76	22,81	1,73
Rolonda V – Holovousy	5,26	4,76	4,46	5,45	0,74
Rolonda Keř – Holovousy	8,82	7,25	6,32	8,77	1,38
Rodnik V – Holovousy	2,36	0,11	2,73	1,73	1,31
Rodnik Keř – Holovousy	5,74	5,03	4,64	5,74	0,66
Tamara V – Vondráček	7,97	6,85	8,68	7,83	0,85

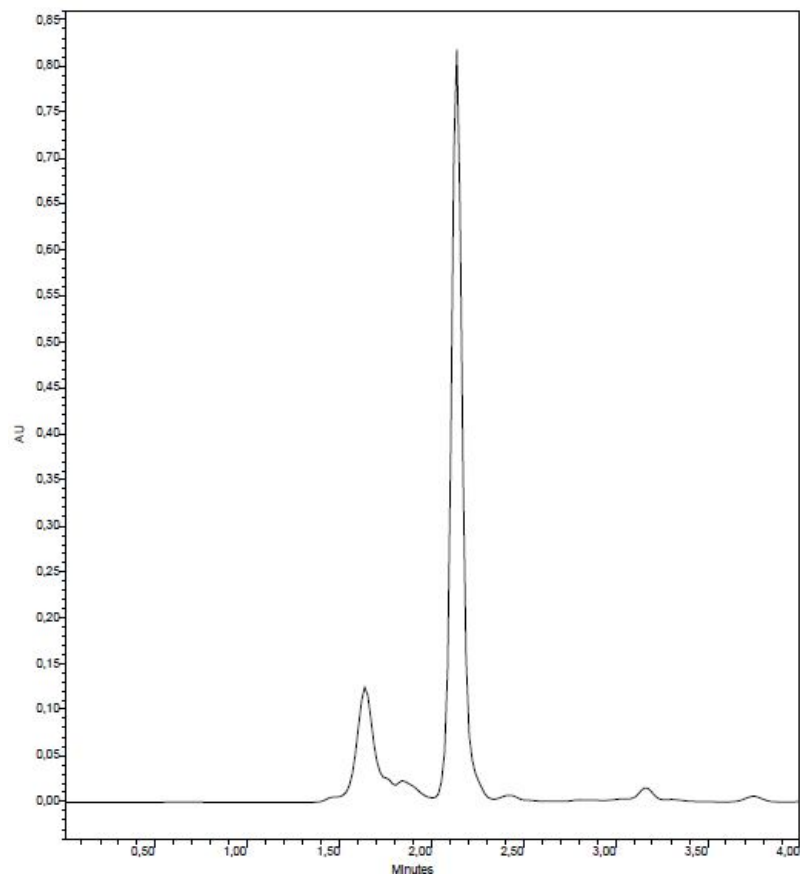
Příloha 2: Obsah celkových polyfenolů stanovených v jednotlivých odrůdách angreštu

Zelenoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g⁻¹]				IS
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Rixanta V – Vondráček	62,63	49,55	63,56	58,58	7,24
Rixanta Keř – Vondráček	58,41	43,47	60,26	54,05	8,51
Rixanta V – Holovousy	101,12	98,23	103,56	100,97	2,47
Rixanta Keř – Holovousy	126,45	129,56	126,66	126,56	2,73
Mucurines V – Holovousy	58,31	56,56	60,26	58,38	1,71
Mucurines K – Holovousy	50,26	49,23	51,27	50,25	0,94
Prima V – Vondráček	77,88	76,56	78,51	77,65	0,92
Zebín V – Vondráček	116,22	114,56	118,61	116,46	1,88

Žlutoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g⁻¹]				IS
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Invicta V – Vondráček	79,48	81,24	67,00	75,90	7,17
Invicta Keř – Vondráček	67,24	69,56	63,30	66,70	2,93
Invicta V – Holovousy	148,98	153,56	142,57	148,37	5,10
Invicta Keř – Holovousy	126,92	128,65	123,56	126,38	2,39
Citronový obří V – Vondráček	65,10	63,65	67,02	65,26	1,56
Citronový obří Keř - Holovousy	60,91	58,65	62,42	60,66	1,75
Darek V – Vondráček	55,63	56,32	54,97	55,64	0,62
Zlatý fík V – Vondráček	125,22	128,62	123,65	125,83	2,35

Červenoplodé odrůdy	Celkový obsah monomerního pigmentu <i>c</i> [mg·100 g ⁻¹]				IS
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Hinnonmaki Rot V – Vondráček	87,52	86,25	89,12	87,63	1,33
Hinnonmaki Rot Keř – Vondráček	96,03	97,85	95,26	96,38	1,23
Hinnonmaki Rot V – Holovousy	83,30	82,56	84,52	83,46	0,91
Hinnonmaki Rot Keř – Holovousy	97,71	99,13	95,78	97,54	1,55
Karát V – Vondráček	189,99	184,01	201,35	191,79	7,14
Karát Keř – Vondráček	128,75	125,79	131,26	128,60	2,53
Karát V – Holovousy	84,88	83,13	97,10	88,37	7,03
Karát Keř – Holovousy	114,00	116,24	103,33	111,19	6,37
Krasnoslawjankij V – Vondráček					
Krasnoslawjankij Keř – Vondráček	123,54	120,68	126,53	123,58	2,70
	129,41	132,22	126,35	129,32	2,71
Krasnoslawjankij V – Holovousy	171,52	158,73	183,27	171,13	11,34
Krasnoslawjankij Keř – Holovousy	170,56	162,46	180,37	171,17	8,29
Remarka V – Vondráček	56,22	56,35	55,16	55,91	0,60
Remarka Keř – Vondráček	37,55	37,16	37,92	37,54	0,35
Remarka V – Holovousy	63,75	62,46	64,23	63,48	0,85
Remarka Keř – Holovousy	77,68	79,16	76,26	77,70	1,34
Alan V – Holovousy	184,62	173,56	190,36	162,85	7,89
Alan K – Holovousy	249,51	231,98	257,48	246,32	12,05
Alan V – Vondráček	122,48	120,56	124,56	122,54	1,85
Karmen V – Vondráček	87,39	85,36	89,65	87,47	1,99
Karmen Keř – Vondráček	93,71	92,56	95,06	93,78	1,15
Karmen V – Holovousy	187,34	170,24	188,80	182,13	9,54
Rolonda V – Holovousy	128,49	132,16	126,02	128,89	2,85
Rolonda Keř – Holovousy	162,06	156,16	165,56	161,26	4,39
Rodnik V – Holovousy	78,64	73,09	79,26	77,00	3,14
Rodnik Keř – Holovousy	123,67	120,56	125,97	123,40	2,51
Tamara V – Vondráček	178,64	176,35	186,22	180,40	4,77

Příloha č. 3: Chromatogram pro odrůdu Zlatý fík



Obrázek č. 20: Chromatogram kyseliny askorbové u odrůdy Zlatý fík

Příloha č. 4: Naměřené hodnoty pro stanovení koncentrace kyseliny askorbové

Zelenoplodé odrůdy	Plocha píku [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]				Koncentrace vitaminu c [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Rixanta V – Vondráček	1818842	1872786	2068434	1920021	29,42
Rixanta Keř – Vondráček	1940749	1755385	1785125	1827087	27,99
Rixanta V – Holovousy	3004861	2569450	2919118	2831143	43,38
Rixanta Keř – Holovousy	2918820	2247279	2736223	2634108	40,36
Mucurines V – Holovousy	1487569	1528151	1579176	1531632	23,47
Mucurines K – Holovousy	1418064	1477651	1459123	1451613	22,24
Prima V – Vondráček	2049925	2242715	2235216	2175952	33,34
Zebín V – Vondráček	2970444	3289006	3422107	3227186	49,44

Žlutoplodé odrůdy	Plocha píku [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]				Koncentrace vitamínu c [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
Invicta V – Vondráček	2492846	2401178	2380833	2424953	37,15
Invicta Keř – Vondráček	1926940	1853546	1782795	1854427	28,41
Invicta V – Holovousy	1795527	1921708	2135080	1950772	29,89
Invicta Keř – Holovousy	1926139	2056664	1928378	1970394	30,19
*Citr. obří V – Vondráček	2593047	2845062	3026616	2821575	43,23
Citr. obří Keř – Holovousy	3103615	2695187	2658488	2819097	43,19
Darek V – Vondráček	2642149	2315525	2621014	2526229	38,70
Zlatý fík V – Vondráček	3679719	3575986	3664801	3640169	55,77

*Citr. Obří = Citronový obří

Červenoplodé odrůdy	Plocha píku [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]				Koncentrace vitamínu c [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	
*H. Rot V – Vondráček	2495056	2460515	2448471	2468014	39,71
H. Rot Keř – Vondráček	2331328	2231391	2306679	2289800	36,83
H. Rot V – Holovousy	2135387	2053732	2175819	2121646	36,09
H. Rot Keř – Holovousy	2629385	1900398	1759841	2096541	35,66
Karát V – Vondráček	2004192	2073675	2015762	2031210	32,65
Karát Keř – Vondráček	2148535	2120809	2136013	2135119	34,33
Karát V – Holovousy	2668171	2641216	2731575	2680321	43,13
Karát Keř – Holovousy	2366590	2360126	2421956	2382891	38,33
Krasno. V – Vondráček	3512860	3355857	3470570	3446429	52,80
Krasno. Keř – Vondráček	3266777	3069854	3304200	3213610	49,24
Krasno. V – Holovousy	2444298	2463839	2301633	2403257	38,66
Krasno. Keř – Holovousy	2393184	2476835	2447116	2439045	39,24
Alan V – Holovousy	2550095	2572970	2342772	2488612	42,37
Alan K – Holovousy	2455851	2391743	2373115	2406903	40,97
Alan V – Vondráček	2482581	2400403	2343666	2408883	41,00
Remarka V – Vondráček	2228312	2328091	2259722	2272042	38,66
Remarka Keř – Vondráček	1540276	1660293	1555964	1585511	26,91
Rolonda V - Holovousy	3436249	3199271	3268959	3301493	53,36
Rolonda Keř – Holovousy	2347609	2208761	2030160	2195510	35,42
Rodník V – Holovousy	1793667	1768215	1757002	1772961	30,12
Rodník Keř – Holovousy	1686796	1770363	1676231	1711130	29,06

* H. Rot = Hinnonmaki Rot